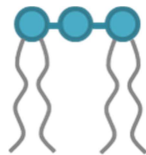


Aus dem Institut für Immunologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stefan Bauer  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

# **Untersuchung der immunstimulatorischen Eigenschaften des Phospholipids Cardiolipin**

*Investigation of the immunostimulatory properties of the phospholipid cardiolipin*



Inaugural- Dissertation  
zur Erlangung  
des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Jessica Susann Kleer  
aus Büdingen

Marburg,  
2017

Angenommen vom Fachbereich der Philipps-Universität Marburg am: 19.10.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. Stefan Bauer

1.Korreferent: Herr Prof. Dr. Michael Lohoff

**Für meine Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	1
2	Abstract .....	3
3	Einleitung .....	4
3.1	Das Immunsystem im Überblick .....	4
3.1.1	Das angeborene Immunsystem .....	5
3.1.2	Muster-erkennende Rezeptoren (PRR) .....	6
3.1.3	Monozyten .....	9
3.1.4	Thrombozyten .....	12
3.2	Cardiolipin .....	13
3.2.1	Struktur und Synthese .....	14
3.2.2	Funktion .....	15
3.2.3	Cardiolipin im Kontext des Immunsystems .....	16
3.3	Der MAP-Kinase-Weg .....	16
3.4	Zielsetzung .....	18
4	Material .....	20
4.1	Geräte .....	20
4.2	Chemikalien und Reagenzien .....	21
4.3	Puffer und Lösungen .....	23
4.4	Medien für Zellkultur .....	24
4.5	Antikörper .....	24
4.6	Enzyme und Reagenzien .....	25
4.7	Stimuli und Inhibitoren .....	25
4.8	Verbrauchsmaterialien .....	26
4.9	Kits .....	27
4.10	Software .....	27
5	Methoden .....	28

5.1	Zellkultur.....	28
5.1.1	Medien .....	28
5.1.2	Isolierung humaner PBMC's.....	28
5.1.3	Separation humaner Monozyten.....	29
5.1.4	Thrombozyten-Präparation .....	30
5.1.5	Zellzählung .....	31
5.1.6	In vitro-Stimulation von humanen Monozyten .....	31
5.2	Proteinbiochemische Methoden.....	35
5.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	35
5.2.2	Western Blot.....	35
5.2.3	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA).....	36
5.3	Fluoreszenzfärbung.....	38
5.4	Durchflusszytometrie.....	39
5.4.1	Probenvorbereitung für die Durchflusszytometrie .....	39
6	Ergebnisse .....	40
6.1	Cardiolipin in Kombination mit Thrombozyten und Dotap induziert die Freisetzung von IL-6 in humanen Monozyten. ....	40
6.2	Untersuchungen zur Funktion von Dotap.....	41
6.2.1	Stimulation der humanen Monozyten mit komplexiertem Cardiolipin .....	41
6.2.2	Stimulatorisches Potential von Cardiolipin abhängig von Zeitintervall zwischen Dotap- und Cardiolipin- Zugabe .....	46
6.2.3	Die Aufnahme von Cardiolipin in humane Monozyten erfolgt Dotap-unabhängig .....	49
6.3	Thrombozyten lagern sich an Monozyten an .....	51
6.4	Untersuchung der ERK-Aktivierung nach Stimulation der humanen Monozyten.....	52
6.5	Beteiligung des Inflammasoms.....	54
7	Diskussion.....	56
7.1	IL-Induktion durch Cardiolipin in humanen Monozyten .....	57
7.2	Einfluss von Dotap auf die IL-6-Induktion durch Cardiolipin in humanen Monozyten.....	58

7.2.1	Komplexierung des Cardiolipins .....	58
7.2.2	Zeitintervall zwischen Cardiolipin- und Dotap-Zugabe zu Monozyten .....	61
7.2.3	Dotap- unabhängige Aufnahme von Cardiolipin in die humanen Monozyten.....	62
7.3	Thrombozyten lagern sich an Monozyten an .....	63
7.4	ERK-Aktivierung nach Stimulation der humanen Monozyten .....	65
7.5	Beteiligung des Inflammasoms an der Zytokinproduktion .....	67
8	Literaturverzeichnis .....	70
9	Anhang.....	77
9.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	77
9.2	Danksagung .....	78

## Schlagwörter

Medizin	medicine
Immunologie	immunology
Immunsystem	immune system
Cardiolipin	Cardiolipin
Dotap	Dotap
Thrombozyten	platelets
Thrombozyten-Monozyten-Komplexe	platelet-monocyte complexes
Monozyten	monocytes
Endosymbionten-Hypothese	endosymbiotic theory
Mustererkennungsrezeptoren	pattern recognition receptors
Pathogen-assoziierte molekulare Muster	pathogen associated molecular pattern
Schaden assoziierte molekulare Muster	damage associated molecular pattern
Interleukin-6	Interleukin-6
Erk	Erk
Nlrp3 Inflammasom	Nlrp3 inflammasome

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
ADP	Adenosindiphosphat
α-oxCL	Antikörper gegen oxidiertes Cardiolipin
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APS	Antiphospholipidsyndrom
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BMDC	bone marrow derived dendritic cell
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAMPs	antimikrobielle kationische Peptide des Wirts (host cationic antimicrobial peptides)
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	cluster of differentiation
CDP-DAG	Cytidindiphosphodiacylglycerol
CL	Cardiolipin
CL-ND	Cardiolipin-Nanodisc
CIs	Cardiolipinsynthase
CpG	Cytosin Phosphat Guanin
CRP	C-reaktives Protein
CTP	Cytidintriphosphat
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
CytD	Cytochalasin D
DAMP	danger associated molecular pattern
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular-signal regulated kinase
FACS	fluorescence-activated cell sorting
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin



h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF	Interferon-Regulationsfaktor
JNK	C-Jun-N-terminale Kinasen
k	kilo
l	Liter
LDL	low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucine rich repeat
M	molar
MBL	Mannose bindende Lektin
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MDA-5	melanoma differentiation-associated gene 5
MEK	MAPK/ERK kinase
mg	milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
ND	Nanodisc
NF-κB	Nuklearer Faktor kappa B nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK	Natürliche Killer
NLR	Nod-like receptor
nm	nanometer
Nod	nucleotide oligomerization domain
OD	optische Dichte
OPD	O-phenyl-Diamine
oxCL	Oxidiertes Cardiolipin
oxLDL	Oxidiertes low density Lipoprotein
PAF	platelet activating factor
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBMC	peripheral blood mononuclear cell

PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBS <sup>++</sup>	PBS mit Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup>
PBS <sub>def</sub>	PBS ohne Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup>
PMP	Platelet microbicidal protein
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PRR	pattern recognition receptor
PSGL	P-Selectin Glykoprotein Ligand
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
RIG-I	retinoic acid inducible gene I
RLR	RIG-I-like receptor
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SAPK	Stress-activated protein- Kinases
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sec	Sekunden
sPLA	sekretorische Phospholipase A
SRA	Scavenger Rezeptor A
TCR	T cell receptor
TGF	transforming growth factor
TIR	Toll/ Interleukin-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TREM	triggering receptor expressed on myeloid cells
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN-beta
U	unit
UV	ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
w/v	weight per volume
wt	Wildtyp
z. B	zum Beispiel

# 1 Zusammenfassung

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung der immunstimulatorischen Fähigkeiten des Phospholipids Cardiolipin. Cardiolipin erfüllt die Kriterien eines Pathogen-assoziierten-molekularen-Musters (pathogen-associated molecular pattern; PAMP). Zudem wurde es als Bestandteil von Lipoproteinen niederer Dichte (Low Density Lipoprotein; LDL) nachgewiesen, welche nach oxidativer Modifikation von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt werden. Es wurde daher vermutet, dass Cardiolipin immunstimulatorische Eigenschaften hat.

Initial konnte in dieser Arbeit per Stimulationsversuchen nachgewiesen werden, dass Cardiolipin in der Lage ist, eine Interleukin-6 (IL-6) Antwort in humanen Monozyten zu induzieren. Jedoch ist diese IL-6 Induktion abhängig von der Kostimulation der Monozyten mit Thrombozyten und Dotap.

Wie Viktoria Laukemper in vorhergehenden Arbeiten gezeigt hat, führen Thrombozyten über extrazelluläre-Signal regulierte Kinasen (extracellular-signal regulated kinase; ERK) zu einer Kostimulation der Monozyten. Daher wurde in dieser Arbeit der Mechanismus, mit dem Dotap die Stimulation der Monozyten durch Cardiolipin beeinflusst, untersucht.

In einem Versuch in dem DOTAP durch komplex-formende Substanzen ersetzt wurde, konnte nicht nachgewiesen werden, dass dieses für die Aufnahme des Cardiolipins in die Zelle notwendig ist. Nachdem auch die Ergebnisse einer Kinetik-Analyse darauf hindeuteten, dass Dotap nicht die Aufnahme des Cardiolipins in die Zelle vermittelt, konnte im Rahmen von Fluoreszenzfärbungen gezeigt werden, dass Cardiolipin eigenständig in die Zellen gelangt. Zudem zeigten die Fluoreszenzfärbungen, dass Cardiolipin innerhalb der Zelle partikuläre Strukturen formt.

In weiteren Experimenten muss geklärt werden, in welches Zellkompartiment Cardiolipin aufgenommen wird. Im Zuge der Mikroskopie konnte weiterhin gezeigt werden, dass Thrombozyten ebenfalls Cardiolipin aufnehmen. Da Thrombozyten nicht zur aktiven Aufnahme von Stoffen fähig sind, konnte so bewiesen werden, dass Cardiolipin passiv in Zellen gelangt.

Da im Rahmen der Fluoreszenzfärbung zudem gezeigt wurde, dass Thrombozyten während der Stimulation an die Monozyten binden, wurde nachgewiesen, dass Thrombozyten durch direkte Interaktion zu einer Aktivierung der Monozyten beitragen.

Western Blot Analysen sollten zeigen ob DOTAP seinen Effekt auf die Monozytenstimulation durch Induktion einer kostimulatorischen Kaskade ausübt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass DOTAP den ERK- Weg induziert, jedoch

nicht, dass es durch diesen Mechanismus zu einer Aktivierung der Monozyten kommt. Weitere Experimente über die wechselseitige Beeinflussung der Mitogen-aktivierten Proteine (mitogen-activated protein; MAP) untereinander sind nötig, um den intrazellulären Mechanismus zu klären, der hinter der Zytokinproduktion nach Stimulation mit Cardiolipin liegt.

Parallel wurde untersucht, ob exogen zugeführtes Cardiolipin durch das Inflammasom erkannt wird. Dies wurde für den Fall einer Kostimulation mit DOTAP und Thrombozyten nachgewiesen. Die Rolle des DOTAP wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig verstanden. Es ist möglich, dass es das Cardiolipin innerhalb des Zytosols stabilisiert, sodass es durch das Nlrp3-Inflammasom erkannt werden kann.

## 2 Abstract

The aim of this research was the investigation of the immunostimulatory properties of the phospholipid cardiolipin. Cardiolipin meets the criteria of a PAMP and is a component of LDL particles, which are recognized by receptors of the innate immune system as a result of oxidative modification. Previous publications suggest that cardiolipin acts immunogenic.

In stimulation experiments, it could initially be detected that cardiolipin is able to induce IL-6 response in human monocytes; however, this induction depends on the co-incubation with platelet and DOTAP.

As previous experiments by our Research Group have shown that platelets cause co-stimulation of monocytes through the ERK pathway, this study investigated the mechanism by which DOTAP influences the stimulation of monocytes via cardiolipin.

By replacing DOTAP with complex-forming substances, it could not be proven that DOTAP is needed for cardiolipin uptake. Results of kinetic analyses also indicated that DOTAP does not mediate the uptake of cardiolipin into monocytes, as fluorescent dye helped to detect that cardiolipin independently enters the cells. The fluorescent staining also allowed the observation that cardiolipin forms particulate structures within the monocytes. Further studies are needed to show in which cellular compartment cardiolipin localizes after entering the cells. Microscopical examination further demonstrated that platelets also take up cardiolipin. Thus, it was shown that cardiolipin passively enters the cell. The fluorescent staining revealed that the platelets attach to the monocytes during the stimulation, therefore it could be seen that platelets contribute to the activation of monocytes by directly interacting with them. Furthermore, Western blot was used to examine whether DOTAP exerts its effect by inducing a co-stimulatory signalling cascade. Indeed it could be shown that DOTAP induces the ERK pathway, without giving evidence to activate monocytes through this mechanism. Further investigation into how the MAP kinase pathways influence each other must seek to clarify the intracellular processes which lie behind the cytokine production after stimulation with cardiolipin.

Parallel to these examinations, it was investigated whether exogenous cardiolipin is recognized by the inflammasome. This could be demonstrated in the case of co-stimulation with DOTAP and platelets. However, the role of DOTAP could not be fully understood in the context of this work. It is possible that it stabilizes cardiolipin within the cytosol, allowing it to be detected there by Nlrp3-inflammasome.

## 3 Einleitung

### 3.1 Das Immunsystem im Überblick

Das Immunsystem hat die physiologische Aufgabe den Körper vor schädlichen Substanzen, infektiösen Mikroben oder fehlerhaft gewordenen eigenen Körperzellen zu schützen. Es ist daher definiert als die Gesamtheit der Zellen, Gewebe und Moleküle, die die Integrität des Körpers wahrt. Das Immunsystem lässt sich bei Vertebraten in angeborene Immunität und erworbene/adaptive Immunität gliedern. Sowohl dem angeborenen als auch dem adaptiven Immunsystem können zelluläre und humorale Bestandteile zugeordnet werden.

Die angeborene Immunantwort ist seit der Geburt in ihrer endgültigen Form vorhanden und vermittelt den initialen Schutz vor Infektionen, während sich die adaptive Immunantwort erst im Laufe des Lebens entwickelt und während einer Infektion zeitlich verzögert eintritt.

Die adaptive Immunantwort passt sich dabei an die jeweiligen Erreger an und stellt somit die spezialisiertere und effektivere Abwehr gegen Infektionen dar.

Die primäere Abwehr gegen Pathogene wird durch Epithelbarrieren bereitgestellt sowie Zellen und natürlichen Antibiotika, die im Epithel präsent sind. Falls Mikroben das Epithel überwinden und ins Gewebe oder den Kreislauf eintreten, werden sie zunächst mit dem angeborenen Immunsystem konfrontiert. Das heißt sie werden durch Phagozyten, natürliche Killerzellen und verschiedenen Plasmaproteinen, wie zum Beispiel das Komplementsystem, angegriffen. Zudem induziert das angeborene Immunsystem das adaptive Immunsystem und determiniert die Art der adaptiven Immunantwort, die nach circa 96 Stunden eintritt.

Während das angeborene Immunsystem durch Keimbahn kodierte Rezeptoren nur Strukturen bzw. Muster erkennt, die evolutiv konserviert sind, sind die Zellen des adaptiven Immunsystems, die T- und B-Lymphozyten, durch die Art ihrer Rezeptoren dazu in der Lage, eine viel höhere Vielfalt an Molekülen spezifisch zu erkennen. Da so viele Rezeptorvarianten nicht im Genom codiert sein können, sind die Regionen der Rezeptoren in mehreren Stücken codiert. Diese werden, während der Lymphozytenentwicklung, durch zufällige Rekombination zusammengebaut, sodass ein riesiges Spektrum an Antigenspezifitäten entsteht. Während der Entwicklung der T-Lymphozyten im Thymus und der B-Lymphozyten im Knochenmark werden solche Zellen, die körpereigene Moleküle erkennen und angreifen würden, inaktiviert.

Die T-Zell-Rezeptoren (TCR) erkennen Antigene nur dann, wenn diese auf den Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex; MHC) spezieller antigenpräsentierender Zellen präsentiert werden.

Die B-Zellen tragen als Rezeptoren Immunglobuline (Ig) und können Antigene ohne die Hilfe antigenpräsentierender Zellen erkennen.

Die Zellen des adaptiven Immunsystems halten sich in Lymphknoten auf, wo Gewebeflüssigkeit, in der Antigene gelöst sein können, gefiltert wird. Antigenpräsentierende Zellen, insbesondere dendritische Zellen (DCs), transportieren zudem aufgenommene Antigene zu den Lymphknoten, um diese dort den T-Lymphozyten zu präsentieren. Erkennt ein T-Lymphozyt sein Antigen, proliferiert er und generiert so mehrere tausend Lymphozyten, die spezifisch für das erkannte Antigen sind. Die T-Zellen aktivieren daraufhin Phagozyten, um Mikroben zu zerstören, die sie phagozytiert haben. Zudem stimulieren sie die B-Zellen zu Antigenbildung. B-Lymphozyten, die ihr Antigen erkennen, entwickeln sich entweder zu Plasmazellen, die Antikörper sezernieren, oder zu B-Gedächtniszellen. Die Antikörper werden in den Kreislauf und in Schleimhautflüssigkeiten sezerniert, um Mikroben und mikrobielle Toxine zu binden und zu eliminieren.

Die Abwehr gegen intrazelluläre Mikroben stellen die zytotoxischen T-Lymphozyten dar. Sie töten Wirtszellen ab, die infektiöse Mikroben beherbergen.

Nach der Infektion werden Gedächtniszellen gebildet, um bei erneutem Kontakt mit dem Antigen bzw. Pathogen eine schnellere und effektivere Abwehrreaktion zu ermöglichen.

(Abbas et al. 2014; Murphy 2012)

### **3.1.1 Das angeborene Immunsystem**

Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch älter als das adaptive Immunsystem und bei allen multizellulären Organismen zu finden. Es vermittelt den initialen Schutz vor Infektionen. Zudem eliminiert es tote oder beschädigte Zellen und Gewebe und initiiert dessen Reparatur.

Die Komponenten des angeborenen Immunsystems sind zum einen physikalische Barrieren, die durch die Epithelien bereitgestellt werden. Zum andern bilden Zytokine und Plasmaproteine den humoralen Arm des angeborenen Immunsystems. Der zelluläre Arm des angeborenen Immunsystems wird durch Phagozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen gebildet.

Die Epithelien stellen als physikalische Barriere den ersten Abwehrmechanismus dar. Im Epithel enthalten sind antibiotische Peptide, wie Defensine und Cathelicidine, welche Mikroorganismen abtöten können. Pathogene, die dennoch in die Blutbahn oder ins Gewebe gelangen, können dort vom Komplementsystem erkannt und angegriffen werden, oder von Phagozyten erkannt, aufgenommen und abgetötet werden.

Das Komplementsystem ist Bestandteil des Plasmas und besteht aus verschiedenen Proteinen, die vor allem durch Kontakt mit der Oberfläche von Krankheitserregern aktiviert werden. In Folge interagieren die Proteine miteinander, um Krankheitserreger zu opsonieren, zu zerstören und Entzündungsreaktionen auszulösen.

Zu den phagozytierenden Zellen des Immunsystems gehören die neutrophilen Granulozyten, dendritische Zellen, Monozyten sowie die ausgereifte Form der Monozyten, die Makrophagen. Während Makrophagen im Gewebe vorkommen und dort eingedrungene Mikroorganismen phagozytieren, zirkulieren die neutrophilen Granulozyten und Monozyten in der Blutbahn. Dendritische Zellen, deren Funktion die Antigenerkennung und Antigenpräsentation ist, kommen sowohl im Blut, als auch in den meisten Geweben vor.

Durch die Bindung von Mikroorganismen oder Produkte beschädigter Zellen an Muster erkennende Rezeptoren (pattern recognition receptors; PRRs) werden die Phagozyten aktiviert. Neutrophile Granulozyten und Monozyten sezernieren daraufhin Zytokine und Chemokine, die weitere phagozytierende Zellen zur Infektionsstelle rekrutieren sowie eine Inflammation initiieren und regulieren.

Erkennen dendritische Zellen oder Makrophagen Pathogene über ihre PRR exprimieren sie kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche. Zudem werden die Bestandteile der phagozytierten Mikroorganismen mittels MHC-II-Komplexen auf ihrer Zelloberfläche präsentiert und so die Aktivierung von T-Zellen ermöglicht. Die dendritischen Zellen bestimmen dabei durch die Expression der kostimulatorischen Moleküle in welche Richtung sich die adaptive Immunantwort entwickelt; ob zum Beispiel in Richtung antivirale, antibakterielle oder antiparasitäre Abwehr. Somit stellen die dendritischen Zellen eine wichtige Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar.

Intrazelluläre Krankheitserreger, wie Viren und intrazelluläre Bakterien, werden aufgrund ihrer Lokalisation nicht von Phagozyten oder dem Komplementsystem erkannt. Sie lösen die Produktion von Typ 1 Interferonen durch infizierte Zellen aus, die die Infektion anderer Zellen inhibieren sowie die Vernichtung infizierter Zellen durch natürliche Killerzellen bewirken.

Natürliche Killerzellen sind eine Klasse von Lymphozyten, die infizierte und beschädigte Zellen erkennen und in Folge deren Apoptose induzieren.

(Janeway, JR und Medzhitov 2002; Abbas et al. 2014)

### **3.1.2 Muster-erkennende Rezeptoren (PRR)**

Die angeborene Immunantwort beruht auf einer limitierten Zahl an Keimbahn-codierten Rezeptoren, die evolutiv konservierte Strukturen von Mikroben, aber nicht die des



Wirtes erkennen. Die Erkennung solcher molekularen Strukturen erlaubt dem Immunsystem zwischen infektiösem „nicht-selbst“ und nicht-infektiösem selbst zu unterscheiden.

Die mikrobiellen Moleküle, die das angeborene Immunsystem stimulieren, werden Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular Patterns; PAMPs) genannt, und die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die diese gemeinsamen Strukturen erkennen, Muster-erkennende Rezeptoren (PRR). Es werden aber auch beschädigte eigene Körperzellen erkannt, die als Gefahr- oder Beschädigung-assoziierte molekulare Muster (danger/ damaged associated molecular pattern; DAMPs) bezeichnet werden.

Die hauptsächlichen Aufgaben der PRRs beinhalten die Induktion von Phagozytose und Apoptose, die Aktivierung von proinflammatorischen Signalübertragungswegen und von Koagulationskaskaden, Opsonierung sowie die Aktivierung des Komplementsystems. Die PRR sind in verschiedenen zellulären Kompartimenten lokalisiert, zum Beispiel auf der Zelloberfläche, im endoplasmatischen Retikulum oder im Zytoplasma, wo sie als Sensoren für zytoplasmatische Mikroben und Zellbeschädigung fungieren. Nur wenige PRRs, wie das Mannose bindende Lektin (MBL), das C-reaktive-Protein (CRP) oder das Serum Amyloid Protein werden ins Blut sezerniert, wo sie an Zellwandbestandteile von Bakterien binden und daraufhin als Opsonine wirken oder das Komplementsystem aktivieren können.

Die zellulären PRRs werden aufgrund struktureller Ähnlichkeiten in mehrere Rezeptorfamilien unterteilt. Als Toll-ähnliche-Rezeptoren (Toll-like-receptors; TLRs) wird eine Gruppe von Rezeptoren bezeichnet, die dem Drosophila Protein "Toll" ähnlich ist. Sie werden auf der Zelloberfläche oder im Endosom exprimiert und dienen als signalgebende Rezeptoren, die die Expression bestimmter Gene induzieren.

Die NOD-ähnlichen-Rezeptoren (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (Nod-like-receptors; NLRs) befinden sich im Zytoplasma. Zu ihren Strukturmerkmalen gehört die Nukleotid-Oligomerisations-Domäne (NOD). Einer der am besten charakterisierte NLR ist der Nlrp-3. Er erkennt mikrobielle Produkte und Substanzen die Zellschäden und -Tod indizieren, zum Beispiel freies Adenosintriphosphat (ATP), Harnsäurekristalle oder Änderungen der intrazellulären Kaliumkonzentration. Auch erkennt der Nlrp-3-Rezeptor endogene Substanzen, wenn diese in großen Mengen in Zellen abgelagert sind, zum Beispiel Cholesterinkristalle und freie Fettsäuren. Nachdem Nlrp-3 aktiviert wurde, oligomerisiert es mit dem Adapterprotein ASC und einer inaktiven Pro-Form des Enzyms Caspase 1. Dieser Komplex aus Nlrp-3, Adapterprotein und Caspase 1 wird Inflammasom genannt. Die

aktivierte Caspase 1 spaltet das Vorläuferprotein des Zytokins IL-1 $\beta$  um biologisch wirksames IL-1 $\beta$ , zu generieren. IL-1 $\beta$  induziert eine akute Inflammation und Fieber.

Die RIG-I-ähnlichen Rezeptoren (RIG-I-like-receptor; RLR), zu denen das *Retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I) und *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA-5) gehören, erkennt virale RNA und initiiert die Produktion antiviraler Typ-I-Interferone.

Als Scavenger Rezeptoren wird eine Familie von Oberflächenrezeptoren bezeichnet, die auf Makrophagen exprimiert wird. Scavenger Rezeptoren binden oxidierte oder acetylierte Lipoproteine niederer Dichte (low-density-lipoproteins; LDL), einige endogene Proteine sowie Pathogene und vermittelt deren Phagozytose. Sie werden entsprechend ihrer Sequenz in 10 eukaryotische Familien klassifiziert; Klasse A-J (Zani et al. 2015).

Lektin Rezeptoren sind ebenso Oberflächenrezeptoren und werden auf Makrophagen, dendritischen Zellen sowie Neutrophilen exprimiert. Sie erkennen fungale Glykane und terminale Mannosereste, die ein typischer Bestandteil bakterieller Zellwände sind. Lektin Rezeptoren sind in der Phagozytose von Pilzen und Bakterien involviert und vermitteln eine inflammatorische Antwort. (Janeway, JR und Medzhitov 2002; Takeuchi und Akira 2010)

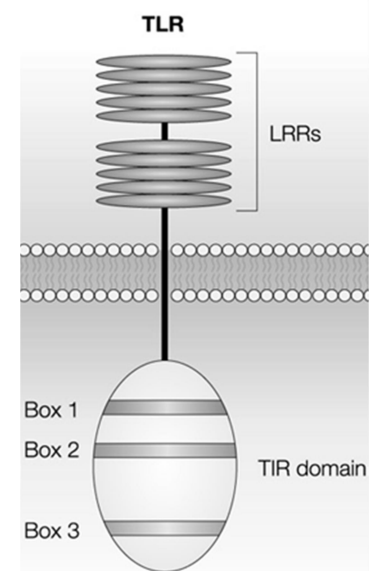
### 3.1.2.1 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Die Toll-like Rezeptoren sind eine Familie Keimbahn-kodierter PRRs, die eine zentrale Rolle in der Erkennung und Antwort auf mikrobielle Pathogene spielen.

Sie bestehen aus Leucin-reichen Sequenzen (leucine rich repeats; LRR), welche die Erkennung der PAMPs vermitteln, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen TIR-Domäne (Toll/IL-1R homology domain), welche für die Signaltransduktion zuständig ist.

Beim Menschen wurden bisher 10 verschiedene Toll-like-Rezeptoren identifiziert, die vor allem auf verschiedenen Zelltypen des angeborenen Immunsystem exprimiert sind, wie Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und Neutrophilen Granulozyten. Sie kommen aber auch auf Zellen des adaptiven Immunsystems und Nicht- Immunzellen wie Fibroblasten und Epithelzellen vor.

Die unterschiedlichen TLRs sind entweder auf der Zelloberfläche (TLR-1, -2, -4, -5, -6) oder im endosomalen und lysosomalen Kompartiment (TLR-3, -7, -8, -9) lokalisiert und erkennen jeweils unterschiedliche PAMPs die von Viren, Bakterien, Pilzen oder



**Abbildung 1: TLR- Struktur** (Übernommen aus der Dissertation von Jenny Großmann)

Parasiten stammen können: Der TLR-2 erkennt einige bakterielle Lipoglykane. Die TLRs 3, 7 und 8 sind spezifisch für virale Nukleinsäuren; TLR-4 ist spezifisch für das bakterielle LPS und Lipoteichonsäure, TLR-5 für Flagellin und TLR-9 für unmethylierte CpG- Oligonukleotide. Das Repertoire an Spezifitäten der TLRs wird jedoch erweitert, indem die TLRs miteinander heterodimerisieren können. Zum Beispiel erkennen Dimere des TLR2 und TLR6 Peptidoglykan. Die Liganden des humanen TLR-10 wurden noch nicht gefunden. (Kawai und Akira 2011; Moresco et al. 2011; Shi et al. 2011; Murphy 2012)

Nach Erkennung des jeweiligen PAMP rekrutieren die TLRs ein spezifisches Set von Adaptermolekülen, zum Beispiel *Adaptor myeloid differentiation factor 88* (MyD88) und *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*  (TRIF), welche die Art der Immunantwort bestimmen.

Mit der Ausnahme von TLR-3, der ausschließlich TRIF verwendet, verwenden alle TLRs MyD88-abhängige Signalwege. Diese resultieren in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B), der daraufhin in den Zellkern transloziert und dort die Expression von Genen wie TNF- $\alpha$ , IL-1, oder IL-6 reguliert. MyD88 kann aber auch nach Aktivierung des TLR 7 und 9 auf plasmazytoiden dendritischen Zellen den Transkriptionsfaktor Interferon-Regulationsfaktor 7 (interferon regulatory factor 7; IRF7) aktivieren, was zur Induktion von Typ I Interferonen führt. Der TRIF-abhängige Signalweg, welcher von TLR-3 verwendet wird, führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 und anschließend zur Induktion von Typ I Interferonen. TLR-4 kann neben dem Myd88-abhängigen Signalweg auch TRIF-abhängige Signalwege induzieren (Kawai und Akira 2011).

Die Erkennung unterschiedlicher PAMPs beeinflusst die Art der Immunantwort durch die unterschiedlichen TLRs und derer unterschiedlicher zellulärer Expression.

Zum Beispiel führt die Erkennung von doppelsträngiger Ribonukleinsäure (dsRNA) durch den TLR3 zu einer frühen adaptiven Immunantwort, wohingegen TLR1, -2 und -4 das angeborene Immunsystem aktivieren, da diese durch bakterielle Produkte aktiviert werden (Abbas et al. 2014).

### 3.1.3 Monozyten

Monozyten bilden 5-10 % der im Blut zirkulierenden Leukozyten und gehören zum mononukleären Phagozytosesystem, welches für die unspezifische Abwehr pathogener Organismen und die Tumor-Überwachung zuständig ist, sowie immunregulatorische Funktionen erfüllt (Grage-Griebenow et al. 2001). Monozyten haben einige typische morphologische Eigenschaften, wie die unregelmäßige Zelloberfläche, den ovalen oder nierenförmigen Kern, zytoplasmatische Granula sowie

einen dünnen Zytoplasmasaum, variieren jedoch in Größe und Granularität (Auffray et al. 2009; Gordon und Taylor 2005).

Die Entwicklung der Monozyten findet im Knochenmark statt. Wie alle Leukozyten stammen sie von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab, die sich zu myeloiden Vorläuferzellen differenzieren (Ogawa 1993). Aus myeloiden Vorläuferzellen gehen neutrophile Granulozyten und Monozyten hervor. Die Monozyten zirkulieren daraufhin einige Tage im Blut bevor sie ins Gewebe migrieren, wo sie, abhängig vom Zielgewebe und den vorherrschenden Entzündungsmediatoren, zu Gewebsmakrophagen oder verschiedenen Klassen von DCs differenzieren (Gordon und Taylor 2005). So stellen sie ein systemisches Reservoir für diese Zellpopulationen dar, bilden aber auch einen großen Pool an Fresszellen und Effektorzellen in Homöostase und inflammatorischen Prozessen (Auffray et al. 2007).

Da Monozyten PRRs, wie zum Beispiel Scavenger-Rezeptoren, aber auch Komplementrezeptoren und Fc-Rezeptoren exprimieren, sind sie zur Phagozytose von Mikroorganismen sowie Lipiden und apoptotischen oder beschädigten Zellen in der Lage (Williams 2007). Stimulierte Monozyten produzieren Effektormoleküle, wie reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species; ROS), Komplementfaktoren, Zytokine, den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) sowie proteolytische Enzyme. Diese sind einerseits in der Abwehr und Beseitigung von Pathogenen beteiligt, spielen aber auch in der Pathogenese von inflammatorischen Krankheiten, wie Arthritis und Atherosklerose, eine Rolle.

(Serbina et al. 2008; Libby et al. 2008; Auffray et al. 2009)

In Säugetieren fungieren Monozyten außerdem als antigenpräsentierende Zellen, welche eine Brücke zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem darstellen.

Humane Monozyten werden in drei Subpopulationen unterteilt, in klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten. Unterschieden werden diese anhand der Oberflächenmarker CD14 und CD16. Klassische Monozyten exprimieren CD14 jedoch kein CD16 (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), während intermediäre Monozyten hohe Spiegel an CD14 aufweisen und geringe an CD16 (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>). Nicht-klassische Monozyten exprimieren höhere Level an CD16 als CD14 (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) (Ziegler-Heitbrock et al. 2010).

Monozyten entwickeln sich schrittweise von klassischen Monozyten über intermediäre zu nicht-klassischen Monozyten, insofern steigen während einer Infektion oder Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (Macrophage colony-stimulating factor; M-CSF) -Behandlung erst die intermediären Zellen an, gefolgt von einem Anstieg der nicht-klassischen Zellen (Weiner et al. 1994). Klassische Monozyten bilden 80-90 %

der Monozyten und weisen eine höhere phagozytotische Aktivität auf, als CD16-exprimierende Monozyten. Sie produzieren hohe Level des Chemokinrezeptors 2 (CCR2), jedoch geringe des CXC-Motiv-Chemokinrezeptor-1 (CX3CR1) und produzieren eher Interleukin (IL) -10 als Tumornekrosefaktor (TNF) - $\alpha$  und IL-1 in Antwort auf Lipopolysaccharid (LPS) Stimulation in vitro.

Im Gegensatz zu dieser Hauptgruppe weisen CD16-tragende Monozyten geringere Mengen des Chemokinrezeptors CCR2 auf, jedoch hohe an CX3CR1, sind für die TNF- $\alpha$ -Produktion auf LPS-Stimulation zuständig und werden proinflammatorisch genannt (Belge et al. 2002; Geissmann et al. 2003; Weber et al. 2000; Ziegler-Heitbrock et al. 1992). Tatsächlich sind CD16+ Monozyten im Blut von Patienten mit akuter Inflammation und infektiösen Krankheiten erhöht und nach Glucocorticoidtherapie erniedrigt (Fingerle-Rowson et al. 1998; Mizuno et al. 2005).

### **3.1.3.1 Monozyten in Entzündungsprozessen**

Für den Übertritt der Monozyten in den Kreislauf ist die Bindung des Monozytenattraktions-Proteins (monocyte chemoattractant protein)-1 und -3 (MCP-1 und MCP-3) an den CCR2 der Monozyten essentiell. Proinflammatorische- und metabolische Stimuli rufen eine gesteigerte Rekrutierung von Monozyten aus dem Knochenmark in die Blutbahn hervor, indem während einer Infektion MCP-1 im Serum ansteigt (Serbina und Pamer 2006). Zirkulierende Monozyten verlassen das Blut in Anwesenheit eines lokalen inflammatorischen Stimulus und wandern in Gewebe ein, wo sie, abhängig von den vorherrschenden Entzündungsmediatoren, zu Gewebsmakrophagen oder verschiedenen Klassen von DCs differenzieren (Gordon und Taylor 2005). Durch die Eigenschaft sich, abhängig von lokalen Entzündungsmediatoren, zu Gewebsmakrophagen oder verschiedenen Klassen von DCs zu differenzieren, spielen Monozyten eine besondere Rolle bei der Einleitung inflammatorischer Prozesse sowie der Bekämpfung von Infektionen (Gordon und Taylor 2005).

Sie können jedoch auch zur Zerstörung von Gewebe und zur Entstehung von entzündlichen Erkrankungen beitragen, wie am Beispiel der Atherosklerose gezeigt werden kann. Die Atherosklerose ist eine Systemerkrankung, bei der es zur Plaqueablagerung aus Lipiden, Thromben und Bindegewebe in der Arterienwand und schließlich zur Thrombose und Gefäßverschluss kommt. Die Pathologie ist durch chronisch inflammatorische Prozesse gekennzeichnet (Hansson 2005). Initiiert wird der arteriosklerotische Prozess durch strukturelle Veränderungen der inneren

Arterienwandschicht, was eine verstärkte Akkumulation von LDL an Proteoglykanen der Intima bewirkt (Moore und Tabas 2011).

In der Intima wird das LDL durch reaktive Sauerstoffspezies und Enzyme oxidativ modifiziert. Oxidierte Lipide und -LDL (oxLDL) lösen eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen und Sekretion von Chemokinen durch die Endothelzellen aus, was zur Infiltration von Monozyten und anderen Leukozyten in die Intima führt. Dort differenzieren sich die Monozyten zu Makrophagen und nehmen die oxidierte Lipide und -LDL über ihre Scavenger Rezeptoren auf, wodurch sie zu sogenannten Schaumzellen werden. Diese erkennt man als so genannte *fatty streaks* (fettige Streifen) in der Arterienwand. Das Auftreten solcher *fatty streaks* stellt ein sehr frühes Ereignis im Verlauf der Arteriosklerose dar (Quehenberger 2005).

Die Aufnahme von oxidierten Lipiden und LDL-Partikeln führt zu Aktivierung der Schaumzellen und weiteren Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen. Die aufgenommenen Lipide werden ins endoplasmatische Retikulum abgegeben. Diese andauernde Belastung des endoplasmatischen Retikulums führt zur Apoptose der Schaumzellen (Weber und Noels 2011).

Da die Phagozytose von apoptotischen Zellen im atherosklerotischem Geschehen defekt ist, kommt es zur sekundären Nekrose. Es bildet sich ein Plaque aus nekrotischen Schaumzellen und Lipiden, der von einer fibrösen Kappe vom Arterienlumen getrennt wird.

Im Falle einer Plaqueruptur kommt es zu einer Thrombusbildung, welche die Ischämie des umliegenden Gewebes zur Folge haben kann (Hansson und Hermansson 2011; Moore und Tabas 2011; Weber und Noels 2011).

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass durch selektive Depletion von Monozyten oder bei einer Blockierung der für die Extravasation von Monozyten wichtigen Chemokine und ihrer Rezeptoren der Prozess der Plaquebildung deutlich verlangsamt oder verhindert wird (Braunersreuther et al. 2006; Braunersreuther et al. 2008; Ylitalo et al. 1994). Am Beispiel der Arteriosklerose wird deutlich, wie die Monozyten entscheidend zur Pathogenese entzündlicher Erkrankungen beitragen.

### **3.1.4 Thrombozyten**

Thrombozyten sind myeloide Zellen, die durch Abschnürung aus den Megakaryozyten des Knochenmarks entstehen und eine Lebensspanne von 8-10 Tagen haben. Sie sind daher kernlos, verfügen jedoch über Mitochondrien. Mit einem Durchmesser von 1-3µm bilden sie die kleinsten Zellen des Blutes (Semple et al. 2011). Obwohl Thrombozyten keinen Zellkern besitzen sind sie in der Lage Proteine zu synthetisieren,

da sie bei der Abschnürung von den Megakaryozyten Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid; mRNA) erhalten (Wicki et al. 1989).

Thrombozyten sind die Haupt-Effektor-Zellen der Hämostase und Koagulation. Ihre Aufgabe besteht darin, im Falle einer Gefäßverletzung an der beschädigten Stelle zu akkumulieren, um diese zunächst abzudichten und die plasmatische Gerinnung zu aktivieren (Freedman 2005; Ruggeri und Mendolicchio 2007; Furie und Furie 2008).

Neben der Aufrechterhaltung der Homöostase besitzen Thrombozyten auch entscheidende Funktionen im Rahmen des angeborenen- und adaptiven Immunsystems (Weyrich et al. 2003; Weyrich und Zimmerman 2004). So exprimieren sie Immunrezeptoren auf ihrer Oberfläche, zum Beispiel Fc-Rezeptoren, oder TLRs, mit denen sie Immunglobuline, bzw. Strukturen von Mikroben erkennen können (Kasirer-Friede et al. 2007; Garraud und Cognasse 2010).

Auch besitzen Thrombozyten Inhaltsstoffe, die aus den Granula aktivierter Thrombozyten freigesetzt werden, die pathogene Mikroorganismen direkt abtöten oder sekundäre inflammatorische Prozesse einleiten können, zum Beispiel die thrombozytären mikrobiziden Proteine (platelet microbicidal proteins; PMPs) (Yeaman 2010; Weyrich und Zimmerman 2004). Durch die Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine, wie CCL5 (RANTES), CXCL4 (platelet factor 4), IL-1 und TGF können sie die Reaktion von andern myeloiden Leukozyten und Lymphozyten sowie Endothelzellen modulieren (Iwasaki und Medzhitov 2010; Danese et al. 2007). Zudem exprimieren sie weitere immunmodulierende Proteine, wie *Triggering receptor expressed on myeloid cells-1* (TREM-1), P-Selectin und den Plättchen aktivierenden Faktor (PAF).

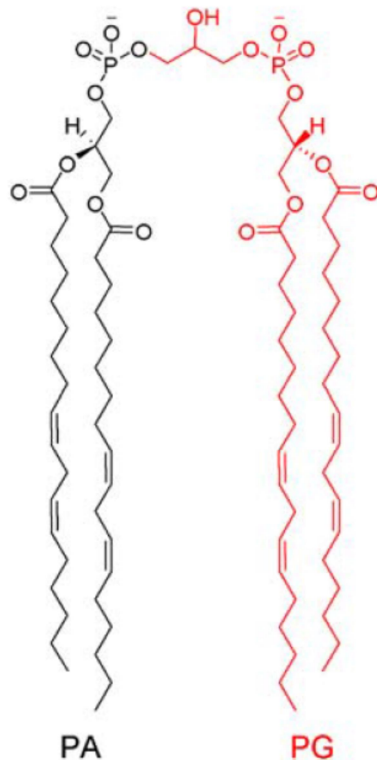
PAF-Rezeptoren sind auf Thrombozyten und anderen myeloischen Zellen exprimiert und erkennen neben PAF bestimmte oxidativ modifizierten Phospholipide. Die Erkennung von PAF oder PAF-ähnlichen Proteinen führt zur Inflammation zu homöostatischen Ereignissen.

Die Bindung von P-Selectin der Thrombozyten an den P-Selectin- Glycoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), der auf unter anderem auf Monozyten exprimiert ist, führt zur Adhäsion der Thrombozyten an den Monozyten und zur Aktivierung der Monozyten mit anschließender Expression inflammatorischer Gene (Vieira-de-Abreu et al. 2012).

### 3.2 Cardiolipin

Cardiolipin (CL) ist ein Phospholipid, welches in der inneren Mitochondrienmembran der Eukaryoten sowie in der Membran der meisten Bakterien vorkommt. Es wurde 1942 erstmals aus Rinderherzen isoliert, wodurch es seinen Namen erhielt (kardia griechisch: Herz). In eukaryotischen Zellen findet man es ausschließlich in der

inneren Mitochondrienmembran, wo es durch seine besondere Struktur essentiell für die Funktion von Enzymen des mitochondrialen Energiemetabolismus ist (Schlame et al. 2000).



**Abbildung 2: Molekulare Struktur des Cardiolipins.** PA= Phosphatsäure, PG=Phosphatidylglycerol, Modifiziert nach (Gonzalvez und Gottlieb 2007)

### 3.2.1 Struktur und Synthese

Cardiolipin ist ein dimeres Phospholipid in dem zwei 1,2-Diacyl-sn-glycerol-3-phosphoryl-Reste über eine zentrale Glycerol Gruppe verbunden sind (siehe Abbildung 2) (LECOCQ und BALLOU 1964). Aufgrund seiner zwei Phosphatgruppen trägt es potentiell zwei negative Ladungen. Da jedoch die Hydroxylgruppen ( $-OH$  und  $-O-$ ) der Phosphate eine Hydrogenbindung mit der Hydroxylgruppe des zentralen Glycerol eingehen, bildet sich eine bityklische Resonanzstruktur in der ein Proton gehalten wird. Daher ist Cardiolipin bei physiologischem pH-Wert ( $\sim pH 7$ ) nur einfach negativ geladen. Nur bei extremen pH-Werten liegt CL ungeladen ( $pH < 3$ ) oder als divalentes Anion vor ( $pH > 10$ ) (Haines und Dencher 2002). Da es vier unterschiedliche Alkylgruppen, trägt ist die potentielle Komplexität dieses Moleküls enorm und die Fettsäurekomposition des Cardiolipin

unterscheidet sich je nach Spezies und Gewebe. CL aus humanem Herzgewebe besteht vor allem aus Linolsäure, während in humanen Lymphoblasten und Hefezellen Palmitoleinsäure und Ölsäure vorherrschen (SCHLAME et al. 1993).

Die Cardiolipinsynthese gleicht, bis auf den letzten Schritt, der Synthese anderer Phospholipide. Der Syntheseweg geht vom Glycerol-3-Phosphat aus. Aus Glycerol-3-Phosphat wird zunächst durch zweimalige Acylierung Phosphatidat synthetisiert. Phosphatidat wird dann durch die Reaktion mit Cytidintriphosphat (CTP) aktiviert, wobei Cytidindiphosphat Diacylglycerol (CDP-DAG) entsteht.

Im letzten Schritt katalysiert die Mitochondrien-assoziierte Cardiolipin-Synthase den Transfer des aktivierten Phosphatidyl-Rests von CDP-DAG auf Phosphatidat, wodurch Diphosphatidylglycerol (Cardiolipin) entsteht. Die Synthese von Cardiolipin der Eukaryonten unterscheidet sich von dem Syntheseweg von Cardiolipin in Prokaryoten, die kein aktiviertes Substrat benötigen, sondern den Phosphatidyl-Rest eines



Phosphatidylglycerols auf die freie Hydroxylgruppe eines anderen Phosphatidylglycerols übertragen.

Nach der primären Synthese durchläuft Cardiolipin zwei Remodellierungsprozesse, um die spezifischen Acylketten zu erhalten (Houtkooper und Vaz 2008; Nowicki et al. 2005). Bei den Remodellierungsprozessen werden vor allem CL-Spezies mit hoher molekularer Symmetrie generiert, die nur zwei verschiedene oder nur eine einzige Fettsäureart tragen. Diese Modifikation ist unabdingbar für die Funktionalität des Cardiolipins und abhängig vom Enzym Tafazzin. Liegt eine Mutation im Gen für Tafazzin vor, kommt es zum X-chromosomal rezessiv vererbten Barth Syndrom, das durch dilatative Kardiomyopathie, zyklische Neutropenie und Myopathie charakterisiert ist (Xu et al. 2006).

### **3.2.2 Funktion**

Cardiolipin ist an der ATP-Produktion beteiligt und daher in Membranen lokalisiert, die mit dem zellulären Energiestoffwechsel assoziiert sind; Bakterien- und Mitochondrienmembranen. Die Aufgabe des Cardiolipins im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung besteht in der Vermittlung zwischen Protonendonatoren und – Akzeptoren, da es durch seine besondere Struktur Protonen in Resonanzstruktur der Kopfgruppe halten kann (Haines und Dencher 2002).

Es konnte zudem gezeigt werden, dass sowohl der Komplex IV als auch der Komplex III der Atmungskette Cardiolipin benötigt, um seine quartäre Struktur und somit seine enzymatische Funktion aufrechtzuerhalten (Gomez und Robinson 1999).

Weiterhin spielt Cardiolipin eine wichtige Rolle bei der Initiation von Apoptoseprozessen. Bei der intrinsischen Apoptose resultiert die Peroxidation von Cardiolipin in der Freisetzung von gebundenem Cytochrom C ins Zytosol, wo es an Apoptose-auslösender Faktor-1 (apoptotic protease activating factor 1; Apaf-1) bindet (Garrido et al. 2006). Apaf-1 oligomerisiert daraufhin zu einem radförmigen Heptamer, das Apoptosom genannt wird. Durch die Konformationsänderung von Apaf-1 wird dessen Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD) zugänglich und bindet an die CARD der Procaspase 9, wodurch diese aktiviert wird und daraufhin die Caspase-Kaskade initiiert (Wang 2001).

Bei der extrinsischen Apoptose bindet Cardiolipin, nach ROS abhängiger Translokation in die äußere Mitochondrienmembran, an die Caspase 8 und dient als Plattform für deren Aktivierung. Die aktive Caspase 8 löst die Caspase-Kaskade aus (Gonzalvez et al. 2008).

### **3.2.3 Cardiolipin im Kontext des Immunsystems**

Antikörper gegen Cardiolipin sind kennzeichnend für verschiedene Erkrankungen und haben einen erheblichen Einfluss auf die Koagulation. Sie sind im Allgemeinen assoziiert mit einem erhöhten Risiko für venöse und arterielle Thromben sowie ischämische Koronare- und zerebrale Erkrankungen (Deguchi et al. 2000). Die Antikörper können beispielsweise bei einer Lues-Infektion nachgewiesen werden und dienen als Verlaufskontrolle der Krankheit (Castro et al. 2000).

Antikörper gegen oxidiertes Cardiolipin ( $\alpha$ -oxCL) sind auch ein wichtiges diagnostisches Merkmal des Antiphospholipid-Syndroms (APS). Dieses beschreibt eine Autoimmunerkrankung, die durch venöse und arterielle Thrombosen gekennzeichnet ist. Die Pathogenese zeichnet sich durch die Bildung von Autoantikörpern gegen anionische Phospholipide, wie Cardiolipin, aus (Deguchi et al. 2000). Die Autoantikörper induzieren die Expression von Gewebefaktor auf Monozyten, hemmen die Produktion von Prostacyclin in Endothelzellen und aktivieren die Thrombozyten, was zu einer gestörten Homöostase führt (Du et al. 2013).

Oxidierte Phospholipide im Blut stammen vor allem aus LDL-Partikeln (Berliner et al. 1997). Diese sind nach Oxidation immunogen und stellen den Hauptrisikofaktor für atherosklerotische Erkrankungen dar (Palinski et al. 1995). Auch Cardiolipin kommt im Plasma gebunden an LDL-Partikeln vor (Deguchi et al. 2000).

Bei der Oxidation der LDL-Partikel wird Cardiolipin, aufgrund seines hohen Anteils an ungesättigten Fettsäuren, ebenfalls oxidativ modifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Spiegel an Antikörper gegen oxidiertes Cardiolipin mit einem erniedrigten Risiko eine kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln einhergehen. Wahrscheinlich weil die Antikörper das oxCL neutralisieren (Su et al. 2013).

Dieses oxidierte Cardiolipin wird zudem von Autoantikörpern aus Patientenserum mit APS erkannt (Deguchi et al. 2000). Dies könnte an der phylogenetischen Herkunft des Cardiolipins liegen. Cardiolipin ist ein Bestandteil von Mitochondrien, die laut der Endosymbiontentheorie ursprünglich Bakterien waren und mit anderen Zellen eine Symbiose eingingen. Für diese Theorie spricht, dass viele Bestandteile der Mitochondrien immunogen sind, wie die mitochondriale DNA (Krysko et al. 2011).

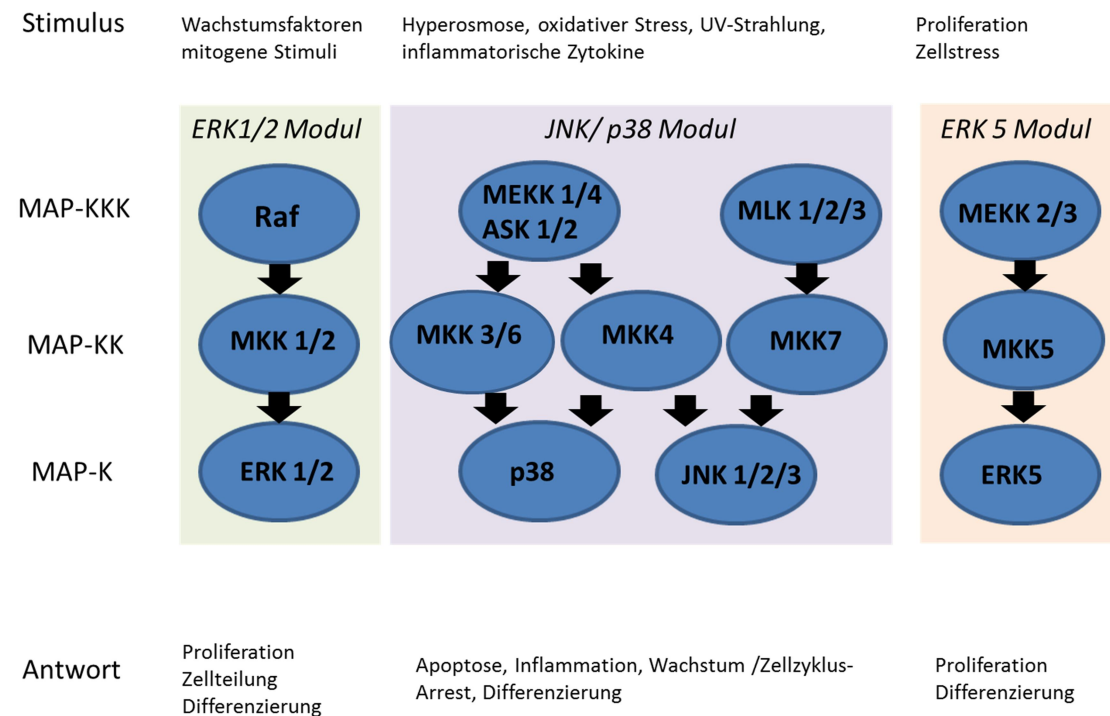
Aufgrund der Endosymbiontentheorie lässt sich vermuten, dass CL ein Gefahrensignal für das angeborene Immunsystem darstellt.

## **3.3 Der MAP-Kinase-Weg**

Die Mitogen-Aktivierte-Protein (Map)-Kinasen umfassen eine Familie von Kinasen, welche an Signaltransduktionskaskaden teilnehmen und zum Repertoire der Zell-Signalmoleküle gehören. Die Kaskaden reagieren auf verschiedene extrazelluläre

Stimuli und regulieren eine Vielfalt zellulärer Prozesse, wie Wachstum, Proliferation, Differenzierung, Stress-Antwort und Apoptose. Diese Kaskaden umfassen mind. 3 Protein-Kinasen in Serie, die in der Aktivierung einer MAP-Kinase gipfeln. Die drei Kinasen in Serie werden als Map-Kinase-Kinase-Kinase (MapKKK), Map-Kinase-Kinase (MapKK) und Map-Kinase (MapK) bezeichnet. Es gibt verschiedene Map-Kinase-Familien, die bekannteste ist die ERK1/2 Familie. Dieses Signalsystem besteht aus drei Kinasen mit den Namen Raf (MAPKKK), Mek (MAPKK) und ERK (MAPK). Raf wird an der Plasmamembran aktiviert, und aktiviert daraufhin Mek, die nun ERK aktiviert. ERK wiederum phosphoryliert eine Vielfalt von nachfolgenden Proteinen, wie andere Kinasen, oder Genregulatorproteine im Kern. Die daraus folgenden Änderungen der Genexpression und der Proteinaktivität verursachen Änderungen des Zellverhaltens. Andere Map-Kinase Familien sind p38 und *c Jun-N-terminal Kinases/ stress-activated protein-Kinases* (JNK/SAPK).

Extrazelluläre Signale aktivieren MAP-Kinasen normalerweise nur vorübergehend, und der Zeitraum, innerhalb dessen die Kinase aktiv bleibt, beeinflusst die Ausprägung der Antwort. Die Art des Signals ist maßgeblich für den Aktivierungszeitraum einer Kinase. Auf die Dauer der Antwort können auch Faktoren wie positive oder negative Rückkopplungsschleifen Einfluss nehmen. Auch bieten die Intermediate der Kaskade verschiedene Mechanismen Inputs von anderen Signalwegen zu erhalten und das Signal an die MAP-Kinase zu verstärken oder zu supprimieren. Die Kaskaden können außerdem untereinander interagieren. Zudem können die MAP-Kinasen Komplexe formen, was ihre Aktivierungsfähigkeit, Lokalisation, Spezifität und Antwort beeinflusst. Viele eukaryotische Zellen besitzen mehrere verschiedene MAP-Kinase-Module, die auf verschiedene Signale reagieren und unterschiedliche Antworten vermitteln. Einen Überblick über die MAP-Kinasen in Säugerzellen gibt Abbildung 3 (Alberts 2011; Pearson et al. 2001; Nishimoto und Nishida 2006).



**Abbildung 3: vereinfachte Darstellung der Map-Kinase-Module in Säugerzellen.** Modifiziert nach <http://de.wikipedia.org/wiki/Map-Kinase-Weg> (22.04.2015).

### 3.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen die immunstimulatorischen Eigenschaften des Phospholipids Cardiolipin untersucht werden. Es soll der Mechanismus geklärt werden, durch den Cardiolipin humane Monozyten zur Zytokinproduktion anregt.

Cardiolipin kommt in der Plasmamembran prokaryotischer Zellen und in der inneren Mitochondrienmembran eukaryotischer Zellen vor. Zudem konnte es in LDL-Partikeln nachgewiesen werden.

Nach der Endosymbiontentheorie haben sich Mitochondrien aus Bakterien entwickelt, die durch Endozytose von Eukaryonten aufgenommen worden sind und mit diesen eine Symbiose eingingen. Analog zu dieser Theorie weisen Mitochondrien bakterielle Eigenschaften auf, wie eine Doppelmembran und ein zirkuläres Genom mit CpG-Motiven. Auf dieser Basis lässt sich ableiten, dass mitochondriale Bestandteile im eukaryotischen Organismus als PAMP fungieren. Für mitochondriale DNA wurde dies bereits nachgewiesen. Es ist jedoch bisher nicht bekannt, ob Cardiolipin im Sinne eines PAMPs immunogen wirkt. Dies soll in dieser Arbeit nachgewiesen werden.

PAMPs sind charakteristische hoch konservierte Struktur motive von Mikroorganismen und stellen ein Gefahrensignal für das Immunsystem dar. Nach Erkennung eines PAMPs durch einen PRR des angeborenen Immunsystems wird eine Entzündungsreaktion eingeleitet um die Infektion zu bekämpfen. Eine Fehlregulierung

dieses Prozesses kann jedoch auch zur Zerstörung von Gewebe und Entstehung entzündlicher Erkrankungen, wie Arteriosklerose führen. Die Arteriosklerose ist bedingt durch die Reaktion des Immunsystems auf oxidativ modifizierte LDL-Partikel, in deren Folge es zu entzündlichen Veränderungen der Gefäß-Intima kommt.

In Stimulationsversuchen konnte nachgewiesen werden, dass Cardiolipin in Koinkubation mit Thrombozyten und dem kationischen Lipid Dotap in der Lage ist, eine Zytokinproduktion in humanen Monozyten zu induzieren (Andreas Kaufmann, Viktoria Laukemper, persönliche Mitteilung). Viktoria Laukemper konnte zudem zeigen, dass die Thrombozyten eine Kostimulation der Monozyten bewirken, indem sie den ERK-Weg aktivieren (Laukemper, Masterarbeit).

Im Rahmen dieser Arbeit soll der molekulare Mechanismus, durch den Dotap die Cardiolipin-induzierte Stimulation beeinflusst, geklärt werden. Dafür werden humane Monozyten mit Dotap und Thrombozyten stimuliert und die Zytokinproduktion mittels der ELISA- Technik quantitativ bestimmt. Durch das Ersetzen des Dotap durch andere Agenzien in diesem System und anschließende quantitative Zytokinbestimmung soll untersucht werden, wie Dotap die Cardiolipin-vermittelte Stimulation von Monozyten beeinflusst.

Zudem sollen Fluoreszenzfärbungen Auskunft darüber geben, ob Dotap die Aufnahme des Cardiolipins in die Monozyten vermittelt.

Des Weiteren soll mittels Western- Blots die durch Cardiolipin, Thrombozyten und Dotap ausgelöste Signaltransduktionskaskade genauer untersucht werden.

Kenntnisse über die Mechanismen der Cardiolipin-vermittelten Monozyten Stimulation könnten helfen, die Pathogenese entzündlicher Erkrankungen wie Arteriosklerose besser zu verstehen und neue Therapieformen zu entwickeln.

## 4 Material

### 4.1 Geräte

Gerät	Modell	Firma, Firmensitz
Analysenwaage	R160P-D1	Satorius GmbH, Göttingen
Analysenwaage	H51-D	Satorius GmbH, Göttingen
Autoklav	Provit 2200	Holzner GmbH, Nussloch
Bakterieninkubator	Innova 4200	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Blot-Modul	PerfectBlue Tank-Elektroblotter Web S	Peqlab, Erlangen
Blot Modul	„Xcell II Mini Cell“ (EI9001)	Novex, San Diego, USA
Blot Imager System	„ChemiDoc XRS“	Biorad, Hercules, USA
Eismaschine	AF 10	Scotsman Ice Systems, Ipswich, UK
Entwicklermaschine	Optimax 2010	PROTEC, Oberstenfeld
Gefrierschrank	Liebherr comfort	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank	Hera freeze	Heraeus, Hanau
Gefrierschrank	REVCO	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Heizblock (Schüttler)	-	PeqLab, Erlangen
Heizblock (Schüttler)	TS-100 Thermoshaker	PeqLab, Erlangen
Inkubator (Zellkultur)	HERA cell 240	Heraeus, Hanau
Konfokales Laserscan Mikroskop	„TCS SP5“	Leica Microsystems, Wetzlar
Kühlschrank	-	BEKO
Kühlschrank		Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer	MR 2002	Heidolph, Schwabach
Mikroliterpipetten		Eppendorf, Hamburg
Mikroliterpipetten		Abimed, Langenfeld
Mikroplattenreader	Fluorstar Omega	BMC Labtchen, Ortenberg
Mikroplattenwaschgerät	Skan Washer 400	Molecular Devices, Ismaning
Mikroskop	Labovert	Leitz, Bielefeld
Mikroskop	Wilovert	Will, Wetzlar
pH-Meter	pH523	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe	Pipetboy comfort	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plattenphotometer	Emax	Molecular Devices, Ismaning
Präzisionswaage	P1000	Mettler Toledo, Gießen

## Material

SDS-Gelelektrophorese-kammer	Perfect Blue Twin S	Peqlab, Erlangen
Schlauchpumpe	BVP (Ismatec)	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
Spannungsquelle	„Standard PowerPack P25“	Biometra, Göttingen
Spannungsquelle	Power Erase 500	Novex, San Diego, USA
Sterilbank	„BIOHIT“	Heraeus, Hanau
Sterilbank	„LaminAir HB 2448“	Heraeus, Hanau
Teflongefäße		Savillex, Eden Prairie
Tischzentrifuge	Picofuge	Stratagene, Amsterdam, NL
Tischzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge	Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Ultraschallbad	Sonorex TK 52	Bandelin electronic, Berlin
Ultraschallstab	UW 2070	Bandelin, Berlin
Vortexer	REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	-	Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen
Werkbank	Hera safe	Heraeus, Hanau
Werkbank	LaminAir HLB 2448	Heraeus, Hanau
Zählkammer	Neubauer, improved	W. Schreck, Hofheim
Zellzähler CASY 1®	TT	Schärfe System, Reutlingen
Zellzentrifuge	Cytospin 2	Shandon, Pittsburgh
Zentrifuge	J2-21 M/E	Beckman
Zentrifuge	TJ-R	Beckman

## 4.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Firma, Firmensitz
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Alexa Fluor® 488 Streptavidin	Life Technologies, Darmstadt
Alexa Fluor® 594 Streptavidin	Life Technologies, Darmstadt
Amoniumpersulfat	Sigma-Aldrich
Ammoniumchlorid reinst (NH <sub>4</sub> Cl)	Roth, Karlsruhe
Bis Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Citronensäure C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Merck, Darmstadt
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Roche, Mannheim
DOTAP Transfection Reagent	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure EDTA	Roth, Karlsruhe

## Material

0,5M EDTA Solution	Thermo Scientific, Rockford
Ethanol 99,9 %	Roth, Karlsruhe
Ethanol, 70%	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid KCl	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat $\text{KHCO}_3$	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Roth, Karlsruhe
Lysozym	Fluka Analytical, Exeter, England
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat (trihydrat)	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS) Roth,	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat-Anhydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphatdihydrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times$ $2 \text{ H}_2\text{O}$	Roth, Karlsruhe
Natriumvanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	Roth, Karlsruhe
Natronlauge, 1N	Roth, Karlsruhe
Proteinmarker (Page Ruler™)	Thermo Scientific
Pancoll humnan (Ficoll)	PAN Biotech, Aidenbach
o-Phenylendiamin-Tabletten	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd, PFA	Roth, Karlsruhe
Proteaseinhibitor cOmplete EDTA-free	Roche, Mannheim
Proteaseinhibitor cOmplete	Roche, Mannheim
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific, Rockford
Roti®-Mount FluorCare	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt
Saponin aus Quillaja Rinde	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schwefelsäure $\text{H}_2\text{SO}_4$	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIS-Acetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Tris-Phosphat	Roth, Karlsruhe



Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Tween20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30%	AppliChem, Darmstadt
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe

### 4.3 Puffer und Lösungen

Puffer	Herstellung
Blockpuffer (ELISA)	10 g 1x BSA, 0,5 ml Tween 20, ad 1 l PBS <sub>def</sub>
Blockpuffer (Western Blot)	5g Magermilchpulver ad 100 ml WB-Waschpuffer (TBS)
Blottpuffer (Western Blot)	6 g Tris, 28,67 g Glycine ad 1600 ml mit ddH <sub>2</sub> O, kurz vor Gebrauch + 400 ml Methanol
10 % EDTA in PBS <sub>def</sub>	2 g EDTA ad 20 ml PBS <sub>def</sub>
ELISA Substratpuffer	7,3 g C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> , 11,87 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O ad 1 l ddH <sub>2</sub> O
Elutiationspuffer	1 ml 10% EDTA, 1 ml humanes AB-Serum, 100 ml 10x PBS ad 1 l ddH <sub>2</sub> O
FACS-Puffer	2% FCS, 0.01% Na-Azid, 2mM EDTA in PBS <sub>def</sub>
Lauf-Puffer (SDS PAGE)	3,03g Tris, 14,41g Glycin, 10 ml 10%iges SDS ad 1l dd ddH <sub>2</sub> O
Lysepuffer	40µl EDTA, 40µl Proteaseinhibitor, 80µl 5M MgCl ad 4ml Ripa Puffer
Lösepuffer	PBS <sub>def</sub> +2mM EDTA+ 3%AB-Serum
4% Paraformaldehyd in PBS <sub>def</sub>	4 g PFA ad 100 ml PBS <sub>def</sub> (steril), bei 60°C unter Rühren lösen
2%ige Paraformaldehyd- Lösung	5ml 4% Paraformaldehyd in PBS <sub>def</sub> , 2% AB-Serum ad 10ml RPMIcomplete
PBS, 10x	2 g KCl, 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 80 g NaCl, 11,5 g, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O ad 1 l ddH <sub>2</sub> O
6 x Probenpuffer nach Lämmli	1,2g SDS, 1,25ml 2-Mercaptoethanol 6 ml Glycerol, 353,275 mg Tris-Base → pH 6,8 einstellen, 500 µl gesättigte wässrige Bromphenolblaulösung ad 10 ml mit ddH <sub>2</sub> O
Ripa-Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sammelgel-Puffer (SDS-Gel)	12 g Tris-Base, ~150 ml ddH <sub>2</sub> O, 10-12 ml HCl (32 %) → pH 6,8 einstellen, dann 8 ml 10 %iges SDS → ad 200 ml ddH <sub>2</sub> O

## Material

Saponinpuffer	0,5g BSA, 0,25g Saponin ad 50 ml ddH <sub>2</sub> O
Trenngel-Puffer (SDS-Gel)	72,8 g Tris-Base, ~350 ml ddH <sub>2</sub> O, 12-13 ml HCl (32 %) → pH 8,8 einstellen, dann 8 ml 10 %iges SDS → ad 400 ml mit ddH <sub>2</sub> O
TBS, 10 x	24g Tris-HCl, 5,6 g Tris-Base, 88g NaCl ad 1l ddH <sub>2</sub> O, pH einstellen auf 7,6
Waschpuffer (ELISA)	500 ml 10x PBS, 2,5 ml Tween 20 ad 5 l ddH <sub>2</sub> O
Waschpuffer (Western Blot)	2,4g Tris-HCl, 0,56g Tris-Base, 8,8g NaCl, 1ml Tween 20 ad 1 l ddH <sub>2</sub> O

### 4.4 Medien für Zellkultur

Name	Firma, Firmensitz
Amino Acids, non-essential, 100x	PAA, Cölbe
humanes AB-Serum	Sigma Aldrich, München
L-Glutamin 200mM (100x)	PAA, Cölbe
Opti-MEM	Gibco, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Cölbe
RPMI1640 (No. E15-041)	PAN Biotech, Aidenbach
Sodium Pyruvat Solution, 100mM	PAA, Cölbe

### 4.5 Antikörper

#### ELISA

Spezifität	Markierung	Ursprung	Firma, Firmensitz
anti-human IL-6		Ratte	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-human IL-6	Biotin	Ratte	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-human IFN- $\alpha$ ,		Maus	eBioscience, San Diego, USA
anti-human IFN- $\alpha$	HRP	Maus	eBioscience, San Diego, USA
anti-human IL-1 $\beta$	Biotin	Ziege	R&D Systems, Minneapolis

**Western Blot**

Spezifität	Markierung	Ursprung	Firma, Firmensitz
P44/42 MAP Kinase		Maus	Cell Signaling, Danvers
Phospho-p44/42 MAPK (ERK 1/2) (Thr202/Tyr2004)		Hase	Cell Signaling, Danvers
Mouse IgG	Peroxidase	Ziege	Jackson ImmunoResearch, West Grove
Rabbit IgG	Peroxidase	Ziege	Jackson ImmunoResearch, West Grove

**4.6 Enzyme und Reagenzien**

Name	Firma, Firmensitz
Humanes IL-6 (10 µg/ml)	Peprotech, Hamburg
Humanes IFN-α (20µg/ml)	Peprotech, Hamburg
Humanes IL-1β	Peprotech, Hamburg
Streptavidin-POD Konjugat (500 U/ml)	Roche, Mannheim
Lysozym	Sigma-Aldrich, Steinheim

**4.7 Stimuli und Inhibitoren**

Name	Firma, Firmensitz
1,1'-Oleoyl-2,2'-(12-biotinyl(aminododecanoyl)) Cardiolipin (Cardiolipin, biotinyliert)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Cardiolipin, gelöst in EtOH	Sigma Aldrich, Steinheim
CpG 2216	TIB Molbio, Berlin
LPS	Difco Laboratories, USA
Luperox® TBH70X	Sigma Aldrich, Steinheim
PBS T7-19 (5'-CCT ATA GTG AGT CGT ATT A-Biotin-3')	Metabion, Martinsried
Primer T7-19 (5'-T*A*A*T*A*C*G*A*C*T*C*A*C*T*A*T*A*G*G-3')	Metabion, Martinsried
Oligo 3 (5'-CCT ATA GTG AGT CGT ATT A-FITC-3')	Metabion, Martinsried
Oligo 5	Metabion, Martinsried

(5'-CCT ATA GTG AGT CGT ATT A-Cy3-3')	
Oligo 8	
(5'-T*A*A*T*A*C*G*A*C*T*C*A*C*T*A*T*A*G*G-TMR-3')	Metabion, Martinsried
Streptavidin	Promega, Madison
U0126	Cell Signaling Technology, Boston, USA
C6 Ceramid	Enzo Life Sciences, Lörrach
U0126	New England Biolabs, Frankfurt

Zur Herstellung der wässrigen Cardiolipinsuspension wurden 2,5 ml der alkoholischen Cardiolipinlösung in einer Glasschale unter Vakuum eingedampft. Das in der Schale zurück gebliebene Cardiolipin wurde mit einem Zellschaber steril zusammengekratzt. Anschließend wurde es in 1,3 ml PBS<sub>def</sub> resuspendiert, sodass eine Endkonzentration von 10 mg/ml resultierte. Abschließend wurde es für 30 min mit Ultraschall behandelt und bei 4°C gelagert.

Mit dem biotinyliertem Cardiolipin wurde analog verfahren. Die wässrige Suspension des biotinylierten Cardiolipins hatte eine Konzentration von 0,5 mg/ml.

## 4.8 Verbrauchsmaterialien

Name	Firma, Firmensitz
6well Flachbodenplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96well Flachbodenplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96well Maxisorp Platte Nunc	Thermo Fisher Scientific, Denmark
96well PolySorp Platte Nunc	Thermo Fisher Scientific, Denmark
96well Rundbodenplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96well Rundbodenplatte, microcon unsteril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Casy-Röhrchen	Schärfe System, Reutlingen
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
FACS Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Filterspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Sorenson Bioscience, USA
Filterpapier	Shandon, Pittsburgh
Handschuhe	NOBA Verbandmittel, Wetter
Kanülen (20G,24G)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kombitips	Eppendorf, Hamburg
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Saarbrücken
Pasteurpipette	Otto Kobe, Marburg
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Plasmidisolations Kit	OMNI life science, Bremen

## Material

Plastikpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PvDF "Immobilon-P Transfermembran"	Millipore, Massachusetts
Reaktionsgefäß 0,2ml	Biostep, Jahnsdorf
Reaktionsgefäß 0,5ml / 1,5ml / 2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 15ml / 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Spitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Spritze „Omnifix“ (10ml)	Braun, Melsungen
Sterilfilter 0,45µm	Sigma-Aldrich, München
Whatman-Papier „GB003“	Schleicher + Schuell, Dassel
Zellkulturschalen	Falcon Becton Dickinson, USA
Zellklemme	Shandon, Pittsburgh
Zelltrichter	Shandon, Pittsburgh
Zellsieb 70µm Nylon	Falcon Becton Dickinson, USA

## 4.9 Kits

BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford
SuperSignal* West Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Rockford

## 4.10 Software

Excel	Microsoft, Redmond, WA, USA
PowerPoint	Microsoft, Redmond, WA, USA
Word	Microsoft, Redmond, WA, USA
SoftMaxPro v5	Molecular Devices, Ismaning

## 5 Methoden

### 5.1 Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank der Sicherheitsklasse 2 durchgeführt.

Die Zellen wurden in einem Inkubator des Typs Hera cell 240 (Heraeus) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Alle Materialien und Geräte wurden, bevor sie zum Einsatz kamen, gereinigt bzw. desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert.

Die verwendeten Medien, Puffer und Reagenzien wurden ebenfalls unter sterilen Bedingungen hergestellt und aufbewahrt.

#### 5.1.1 Medien

Für die Zellkultur wurde folgendes Medium verwendet:

RPMI 1640 complete:

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

1x nicht-essentielle Aminosäuren

1 mM Natriumpyruvat

#### 5.1.2 Isolierung humaner PBMC's

Die peripheren mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) wurden mithilfe der Ficoll-Separation aus Buffy-Coats gewonnen.

Bei der Verarbeitung einer Vollblutspende zu Erythrozyten-Konzentraten und Frischplasma-Produkten entstehen Buffy-Coats als Nebenprodukt. Das Buffy-Coat besteht hauptsächlich aus Thrombozyten und Leukozyten sowie geringen Mengen restlichen Plasmas und Erythrozyten. Die Buffy-Coats wurden aus der Abteilung für Transfusionsmedizin aus dem Universitätsklinikum Gießen Marburg bezogen.

Durch Einsatz eines Separationsmediums lassen sich die PBMCs, zu denen Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen und Natürliche Killer (NK)-Zellen), Monozyten und dendritische Zellen gehören, isolieren.

Als Zellseparationsmedium wurde eine Fertiglösung aus Ficoll und Natriumdiatrizoat benutzt. Es wurden 13 ml Separationsmedium in ein 50 ml Tube gegeben und vorsichtig mit 20-25 ml Buffy-Coat überschichtet, wobei darauf zu achten war, dass möglichst wenig Kontakt zum Ficoll stattfindet.

Nach dem Überschichten wurde 30 Minuten mit 670 g bei 21°C ohne Bremse zentrifugiert. Bei 21°C hat die Ficoll-Lösung eine Dichte von 1,077 g/ml. Da die Ficoll-

Lösung somit eine geringe Dichte als die von Erythrozyten und der meisten Granulozyten besitzt, wandern diese auf den Boden des Falcons. Die mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) reichern sich in der Interphase zwischen Medium und Plasma an. Thrombozyten verbleiben zum größten Teil im Plasma, da sie aufgrund ihres geringen Zellvolumens langsamer sedimentieren.

Das Plasma wurde vorsichtig abpipettiert und die PBMC-Schicht mit möglichst wenig Ficoll in ein neues Falcon überführt. Dieses wurde mit kaltem PBS<sub>def</sub> auf 50 ml aufgefüllt und bei 350×g, auf 4°C, 7 Minuten zentrifugiert. Dabei reichern sich die PBMCs im Pellet an, die Thrombozyten verbleiben jedoch im Überstand.

Der Überstand wurde zur Thrombozyten-Präparation abgenommen. Das Pellet wurde resuspendiert und erneut mit PBS<sub>def</sub> auf 50ml aufgefüllt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin in 30 ml RPMI-complete aufgenommen und zur Separation von Monozyten verwendet.

### 5.1.3 Separation humaner Monozyten

Aus den Isolierten PBMCs wurden die Monozyten mithilfe der zentrifugalen Elutriation separiert. Die zentrifugale Elutriation beruht auf dem Prinzip der Gegenstrom Zentrifugation.

Eine Schlauchpumpe des Typs BVP (Ismatec) pumpt die zu trennende Zellsuspension durch eine konisch geformte Elutriationskammer, die im inneren eines Rotors liegt. Der Zu- und Abgang dieser Kammer zeigen zu Rotorachse, sodass die durch den Flüssigkeitsstrom entstehende Zentripetalkraft zur Rotorachse gerichtet ist.

Dieser entgegengesetzt wirkt eine Zentrifugalkraft, die durch die Rotation entsteht.

Während der Zentrifugation, die mit einer Zentrifuge des Typs 72-2M/E (Beckmann) durchgeführt wurde, ordnen sich die Zellen in Abhängigkeit ihrer Dichte und Größe in der Elutriationskammer an. Da zwischen Flüssigkeitsrate und Rotordrehzahl folgender Zusammenhang besteht:

$$F = X \times D^2 \times (RPM \times 10^{-3})^2$$

*F= Flüssigkeitsrate in ml/min*

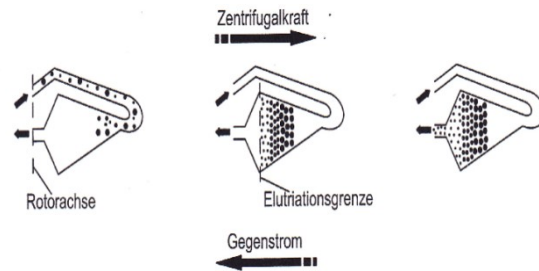
*X=Kammerfaktor: 0,0511*

*D= Zelldurchmesser in µm*

*RPM: Rotordrehzahl pro min*

kann man bei konstanter Rotordrehzahl die Größe der Zellen berechnen, die bei einer bestimmten Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums aus der Kammer gespült werden (siehe Abbildung 4).

Die Elutriation wurde bei einer konstanten Rotordrehzahl von 3000 rpm bei 20°C durchgeführt. Vor Beginn der Elutriation wurde das System mit einer 6 %-igen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung desinfiziert und mit autoklaviertem Wasser gespült.



**Abbildung 4: Elutritationsprozess in der Gegenstromzentrifugation** (Luttmann et al. 2009)

Die PBMC-Suspension wurde bei 6 ml/min eingezogen und anschließend die Fließgeschwindigkeit des

Elutritationsmediums schrittweise erhöht, sodass zunächst Thrombozyten, Erythrozyten, Lymphozyten und NK-Zellen ausgespült wurden.

Die Monozyten wurden als letzte Fraktion bei einer Fließgeschwindigkeit von 36 ml/min ausgespült und in 100 ml Elutritationsmedium aufgefangen.

Die Zellen wurden dann bei  $350 \times g$  für 7 Minuten bei 4°C zentrifugiert und das Pellet in 10 ml RPMI-complete aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit dem Cell Counter (CASY) bestimmt und anschließend für die Stimulation entsprechend eingestellt und mit 4% humanem AB-Serum versetzt. Bis zur Ausplattierung wurde die Zellsuspension auf Eis gelagert.

#### 5.1.4 Thrombozyten-Präparation

Die Thrombozyten wurden aus den Überständen, die bei den Waschrissen der PBMC-Isolation entstehen gewonnen (5.1.2).

Der erhaltene Überstand wurde zunächst 15 Minuten mit  $100 \times g$  bei 4°C, ohne Bremse zentrifugiert, dabei bilden die restlichen Leukozyten ein Pellet, das verworfen wurde. Der Überstand wurde dann 7 Minuten mit  $800 \times g$  bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert und nochmal nach den oben genannten Angaben mit kaltem  $\text{PBS}_{\text{def}}$  gewaschen, bevor es in 10 ml RPMI aufgenommen wurde.

Zur Zellzahlbestimmung wurde die Neubauer-zählkammer verwendet, anschließend wurde die Zellzahl entsprechend der Versuche eingestellt und mit 4% AB-Serum versetzt. Bis zur Ausplattierung wurde die Zellsuspension auf Eis gelagert.

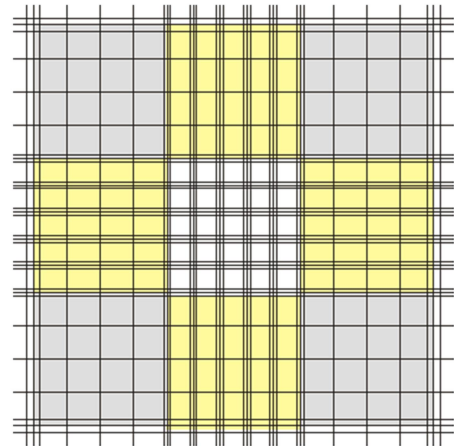


### 5.1.5 Zellzählung

#### 5.1.5.1 Neubauer-Zählkammer

Die Thrombozytenzahl wurde mithilfe der Neubauer improved- Zählkammer bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Thrombozyten Suspension 1:100 in PBS<sub>def</sub> verdünnt und davon 10 µl in die Zählkammer pipettiert. Es wurden fünf der zentralen Gruppenquadrate ausgezählt (weiß). Zur Errechnung der Zellzahl wurde der Mittelwert der ausgezählten Zellen in folgende Formel eingesetzt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \text{Mittelwert} \times 25 \times 10^4 \times 100$$



**Abbildung 5: Neubauer Improved-Zählkammer Schema**, modifiziert aus <https://de.wikipedia.org/wiki/Z%C3%A4hlkammer> 05.01.2016

#### 5.1.5.2 Casy® – Zellanalysesystem

Die PBMC- sowie die Monozyten Zahl wurde mithilfe des Cell Counters (Casy) bestimmt. Dafür wurde 1µl PBMC-Suspension bzw. 10 µl Monozyten Suspension in 10 µl PBS<sub>def</sub> aufgenommen. Von dieser Verdünnung saugt das Gerät automatisch ein Aliquot durch eine Messkapillare, an die mittels zwei Platinelektroden eine Spannung angelegt ist. Jedes Mal wenn eine Zelle durch die Messpore der Kapillare tritt, verdrängt sie, abhängig von ihrer Größe, ein bestimmtes Volumen und erhöht damit den elektrischen Widerstand zwischen den Elektroden, was als elektrischer Puls wahrgenommen wird.

Aus der Menge der Pulse und deren Amplituden kann so die Zahl der Zellen und ihre Größenverteilung ermittelt werden. Für die PBMC-Zählung wurden alle Zellen ab einer Größe von 5,55 µm berücksichtigt, und bei den Monozyten alle Zellen ab einer Größe von 7,65 µm.

### 5.1.6 In vitro-Stimulation von humanen Monozyten

#### 5.1.6.1 Probengewinnung für Elisa

Zur Probengewinnung für das Elisa fand die Stimulation der humanen Monozyten in 96well-Flachbodenplatten statt. Die Zellen wurden dafür mit RPMI-complete auf  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt, mit 4% AB-Serum versetzt und in einem Volumen von

50 µl pro Well ausgesät. Nach Zugabe der Stimuli war in jedem Well ein Volumen von 200µl vorhanden oder wurde mit RPMI-Medium auf 200µl aufgefüllt.

Den Monozyten wurden Thrombozyten in einem Volumen von 50 µl mit 4 %AB-Serum zugesetzt. Die Thrombozyten wurden dazu auf  $100 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt.

Weiterhin erfolgten die Zugabe des liposomalen Transfektionsreagenz Dotap sowie die Stimulation mit Cardiolipin. Dotap wurde in einer Konzentration von 1,5 µl in einem Volumen von 50 µl Opti-MEM pro Well zu den Zellen gegeben.

Für die Herstellung der Cardiolipin-Stimuli wurde die entsprechende Menge der wässrigen Cardiolipin-Suspension mit RPMI-complete so vorverdünnt, dass bei Zugabe von 50 µl zum Stimulationsansatz im Well eine Endkonzentration von 0,625, 1,25, 2,5, 5 bzw. 10 µg/ml erreicht wurde.

Als Positivkontrolle wurde LPS als Ligand des TLR-4 in einer Konzentration von 100ng/ml in einem Volumen von 100 µl RPMI-complete eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden bei jeder Stimulation das verwendete Medium und das Transfektionsreagenz mitgeführt.

#### **5.1.6.1.1 Stimulation mit Komplexen**

Bei der Stimulation der Monozyten mit Komplexen aus biotinyliertem Cardiolipin, Streptavidin und DNA-Oligomeren wurden die Monozyten wie in Absatz 5.1.6.1. beschrieben ausgesät und mit Thrombozyten bzw. Ceramid versetzt.

Für die Herstellung der Komplexe aus biotinyliertem Cardiolipin und Streptavidin wurde das biotinylierte Cardiolipin und Streptavidin mit dest. H<sub>2</sub>O zu 41% und PBS<sub>def</sub> zu 23% so verdünnt, dass in der resultierenden Lösung Streptavidin in einer Konzentration von 5µM und biotinyliertes Cardiolipin in einer Konzentration von 20 µM vorhanden war.

Zur Herstellung der Komplexe aus biotinyliertem Cardiolipin, Streptavidin und Oligomeren wurden zunächst die Oligomere 3 Minuten bei 96°C vorinkubiert, sodass sie sich zusammenlagern. Anschließend wurden die Substanzen so zusammengegeben, dass sowohl das biotinylierte Cardiolipin als auch die zusammengelagerten Oligomere 20 µM und das Streptavidin 10 µM konzentriert waren.

Für die Stimulation wurden die Lösungen so vorverdünnt, dass das biotinylierte Cardiolipin im Well eine Endkonzentration von 1,125, 2,25, 4,5 bzw. 9 µg/ml erreichte. Die Komplexe wurden, soweit nicht anders vermerkt, in einem Volumen von 50 µl eingesetzt.

Die Zellen wurden entweder zusätzlich mit dem liposomalen Transfektionsreagenz Dotap in einem Volumen von 50 µl, wie in Absatz 5.1.6.1 beschrieben, versetzt oder die Wells wurden mit 50µl RPMI-complete auf 200 µl aufgefüllt.

Als Kontrolle wurde unkomplexiertes biotinyliertes Cardiolipin mitgeführt. Für die Herstellung dieser „biotin-Cardiolipin-Stimuli“ wurde die entsprechende Menge der wässrigen biotin-Cardiolipin-Suspension mit RPMI-complete so vorverdünnt, dass bei Zugabe von 50 µl zum Stimulationsansatz im Well eine Endkonzentration von 1,25, 2,5, 5, 10 bzw. 20 µg/ml erreicht wurde.

Zudem wurden die zusammengelagerten Oligomere sowie das Oligomer CPG 2216, als Stimulator der INF- $\alpha$ - Ausschüttung (Vollmer et al. 2004), in einer Konzentration von 1µM, in einem Volumen von 10µl RPMI-complete, als Kontrolle mitgeführt.

Alle Stimulationsansätze wurden für 22 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Überstände der Zellen abgenommen und bei -20°C eingefroren.

#### **5.1.6.2 Stimulation für Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Färbung der Zellen fand die Stimulation der humanen Monozyten in Teflongefäßen statt. Die Zellen wurden dafür mit RPMI-complete auf  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt, mit 4% AB-Serum versetzt und in einem Volumen von 0,25ml pro Well ausgesät.

Als Stimulationsreagenzien wurden Thrombozyten, biotinyliertes Cardiolipin sowie Dotap in verschiedenen Kombinationen, jeweils in einem Volumen von 0,25ml, verwendet.

Die Teflongefäße wurden anschließend jeweils mit RPMI-complete auf 1ml aufgefüllt.

Zur Stimulation wurden die Thrombozyten auf  $100 \times 10^6$  Zellen eingestellt. Das Cardiolipin wurde so in RPMI-complete vorverdünnt, dass im Stimulationsansatz eine Konzentration von 5 µg/ml erreicht wurde. Dotap wurde in einer Konzentration von 7,5 µl in einem Volumen von 250 µl Opti-MEM pro Well zu den Zellen gegeben. Die stimulierten Zellen wurden 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

#### **5.1.6.3 Stimulation mit Oligomeren für FACS-Analyse**

Um herauszufinden, ob die DNA-Oligomere von den Monozyten aufgenommen werden, wurden diese mit komplementären Floreszenz-markierten DNA-Oligomeren in einer Konzentration von 1µM stimuliert und anschließend per FACS und ELISA analysiert.

Die Monozyten wurden mit RPMI-complete auf  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt, mit 4% AB-Serum versetzt und mit einem Volumen von 100 µl pro Well auf einer 96-Well-Platte ausplattiert.

Die DNA-Oligomere wurden jeweils in einem Volumen von 10 µl RPMI verdünnt und so zu den Monozyten gegeben, dass im Well eine Endkonzentration von 1 µM resultierte. Falls kein komplementäres Oligomer hinzugegeben wurde, wurde das Volumen im Well mit 10 µl RPMI aufgefüllt.

Als Positivkontrollen wurden LPS in einer Konzentration von 10 ng/ml in einem Volumen von 20 µl RPMI-complete eingesetzt sowie das Oligomer CPG 2216, in einer Konzentration von 1 µM, ebenfalls in einem Volumen von 20 µl RPMI-complete pro Well. Als Negativkontrollen wurde das verwendete Medium mitgeführt.

Die Zellen wurden für 22h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und eingefroren und die Zellen per FACS-Analysiert (5.4)

#### **5.1.6.4 Probengewinnung für Western Blot**

Zur Probengewinnung für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) und anschließendem Western-Blot wurden die Monozyten in Eppendorfgläsern stimuliert. Dazu wurden die Zellen mit RPMI-complete auf  $20 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt, mit 4% AB-Serum versetzt und mit einem Volumen von 0,25 ml pro Eppendorfglas ausplattiert.

Zu den Monozyten wurden Stimuli, ebenfalls in einem Volumen von 0,25ml, in verschiedenen Kombinationen gegeben. Anschließend wurden die Eppendorfgläser mit Medium auf ein Volumen von 1ml aufgefüllt.

Die Thrombozyten wurden mit RPMI-complete mit 4% AB-Serum auf eine Konzentration von  $1 \times 10^9$  Zellen pro ml eingestellt.

Weiterhin erfolgten die Zugabe des liposomalen Transfektionsreagens Dotap, sowie die Stimulation mit Cardiolipin. Dotap wurde in einer Konzentration von 75 µl in einem Volumen von 0,25 ml Opti-MEM pro Eppendorfglas zu den Zellen gegeben.

Für die Herstellung der Cardiolipin-Stimuli wurde die entsprechende Menge der wässrigen Cardiolipin-Suspension mit RPMI-complete so vorverdünnt, dass bei Zugabe von 0,25 ml zum Stimulationsansatz im Eppendorfglas eine Endkonzentration 2,5 µg/ml erreicht wurde.

Als Positivkontrolle wurde LPS in einer Konzentration von 100ng/ml in einem Volumen von 0,5ml RPMI-complete eingesetzt. Als Negativkontrollen wurde bei jeder Stimulation das verwendete Medium mitgeführt.

Die Eppendorfgläser wurden für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert und danach bei 350×g, für 7 Minuten, bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Monozytenpellets jeweils in 120µl Lysepuffer aufgenommen und 30 Minuten bei 4°C im Laborschüttler geschüttelt. Nachfolgend wurden die Proben bei 10.000×g, 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Abschließend wurden die Überstände abgenommen und bei -80°C gelagert.

## **5.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **5.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Proteinlysate wurden mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli aufgetrennt, um anschließend die entsprechenden Proteine im Western Blot (5.2.2) zu analysieren.

Zur Denaturierung wurden die Zelllysate (5.1.6) mit 6x Laemmli Probenpuffer versetzt und für 5min bei 96°C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben kurz mit der Tischzentrifuge zentrifugiert und in einem Volumen von 20µl auf das Gel aufgetragen. Zudem wurde ein vorgefärbtes Proteinstandardgemisch zur Bestimmung der Molekülmasse aufgetragen.

Es wurden 12%ige Bis-Tris Gele verwendet. Die verwendeten Gele setzen sich aus dem Sammelgel, dass der Konzentrierung der Probe in einer Ebene dient und Trenngel zusammen.

Die negativ geladenen SDS-Moleküle lagern sich an die Proteine an und verleihen diesen eine, der Molekülmasse proportionale, Ladung. Beim Anlegen einer Spannung wandern die Proteine durch das Polyacrylamidnetz vom Minus- zum Pluspol und werden dabei nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt, wobei die Proteine desto schneller durch das Gel wandern, je größer sie sind. Als Laufpuffer in der Gelkammer diene SDS-Laufpuffer. Die angelegte Spannung betrug 100-200 V.

### **5.2.2 Western Blot**

Im Western-Blot wurden die Proteine, die in der SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, im elektrischen Feld auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Zum Proteintransfer wurde das Tank-Blot-System verwendet.

Anschließend wurden die entsprechenden Moleküle über spezifische Antikörper markiert. Der Primärantikörper wurde dabei durch einen Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper gebunden. Die Peroxidase vermittelt den Umsatz von Luminol, das in den verwendeten Substraten enthalten war, wodurch Chemilumineszenz freigesetzt wurde, die mit dem „ChemiDoc XRS“ (Biorad) dokumentiert wurde.

#### **5.2.2.1 Blotten**

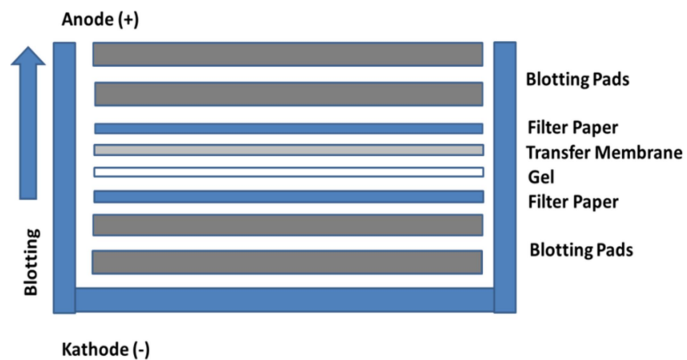
Der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran erfolgte nach dem Tank-Blot System.

Als Blot-Modul wurde das PerfectBlue Tank-Elektroblotter Web S (Peglab) verwendet.

Vor dem Zusammenbau des Blotsystems wurde die PVDF-Membran für 15 Sekunden in Methanol getränkt. Anschließend wurde sie mit Schwämmen und Whatman-Papieren in Transferpuffer überführt. Gel, PVDF-Membran, Schwämme und Whatman-

Papiere wurden entsprechend der Abbildung 6 zwischen Kathode und Anode geschichtet.

Nach dem Zusammenbau wurde das Blot-Modul mit Transfer-Puffer befüllt und anschließend bei 25 Volt für 2h geplottet. Nach dem Lauf wurde PVDF-Membran kurz in Transfer-Puffer, dann 15 Sekunden in Methanol gelegt und schließlich luftgetrocknet.



**Abbildung 6: Schichtung Western Blot in der Blotkammer**

### 5.2.2.2 Immundetektion

Die geblottete und getrocknete PVDF-Membran wurde zunächst zur Aktivierung für 15 Sekunden in Methanol gelegt und anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur schwenkend in ~25 ml Blockpuffer inkubiert.

Zum Nachweis der entsprechenden Proteine wurden die spezifischen Primärantikörper 1:500 in 1 ml Blockpuffer verdünnt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht.

Nach Inkubation wurde die PVDF-Membran drei Mal für 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem, 1:10.000 in 10ml Blockpuffer verdünnten, Peroxidase- gekoppelten Sekundärantikörper unter Schwenken, für eine Stunde, bei Raumtemperatur. Die PVDF-Membran wurde nach der Inkubation drei Mal mit Waschpuffer und einmal mit PBS<sup>++</sup> für jeweils 10 Minuten gewaschen. Danach wurde sie mit „SuperSignal™ West Femto“ (Pierce) als Substrat benetzt und für 1-5 min im Dunkeln inkubiert. Die durch die Reaktion erfolgte Chemilumineszenz wurde mit dem „ChemiDoc XRS“ (Biorad) dokumentiert.

### 5.2.3 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

In dieser Arbeit wurde mit einem Sandwich- Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) gearbeitet, um die, von den stimulierten Monozyten produzierten Zytokin-Mengen, zu quantifizieren. Das Funktionsprinzip des Sandwich-ELISA beruht auf zwei Antikörpern, die gegen unterschiedliche Epitope des Antigens gerichtet sind. Zunächst bindet der Capture Antikörper an eine 96-well Mikrotiterplatte. Daraufhin werden die Proben mit dem nachzuweisenden Antigen, sowie eine 1:2 Verdünnungsreihe eines Standardlösungen, mit bekannten Konzentrationen des Antigens, zu den Wells hinzugegeben.

Die an der Platte gebunden Capture-Antikörper binden dadurch das in der Probe, bzw. Standards, vorhandene Antigen. Anschließend wird ein zweiter, gegen ein anderes Epitop des Antigens gerichteter Antikörper (=Detektionsantikörper), hinzugegeben. An diesem wird chemisch ein Enzym gekoppelt, oder ist bereits vom Hersteller ein Enzym gekoppelt. Dieses Enzym wandelt ein farbloses Substrat, welches daraufhin hinzugegeben wird, in ein farbiges Reaktionsprodukt um. Der Farbumschlag ist proportional zur Antigenmenge.

Aus der Standardreihe wird eine Kalibrationskurve erstellt, anhand der man die Konzentration des nachzuweisenden Antigens bestimmt.

In dieser Arbeit wurde mit einem IL-6-, IFN- $\alpha$ -, sowie IL-1 $\beta$ -ELISA nach folgendem Protokoll gearbeitet.

- ➔ Inkubation des Capture –Antikörpers bei 4°C über Nacht.
- ➔ Ausschlagen der Platte und dreimaliges Waschen mit Waschpuffer
- ➔ 250 $\mu$ l Blockpuffer pro Well, Inkubationszeit: eine Stunde
- ➔ Ausschlagen der Platte und dreimaliges Waschen mit Waschpuffer
- ➔ Inkubation der Proben/ Standards eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.
- ➔ Ausschlagen der Platte und dreimaliges Waschen mit Waschpuffer
- ➔ Inkubation des Detektions-Antikörper eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.
- ➔ Ausschlagen der Platte und dreimaliges Waschen mit Waschpuffer
- ➔ Inkubation des Enzyms Streptavidin horse raddish peroxidase (HRP)- Konjugat 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (Schritt fällt bei IFN- $\alpha$ -ELISA weg).
- ➔ Ausschlagen der Platte und dreimaliges Waschen mit Waschpuffer
- ➔ Starten der Farbreaktion

Dies erfolgte durch Zugabe einer Lösung aus 20ml Substratpuffer mit einer einer 20 mg OPD-Tablette und 10  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Peroxidase katalysiert die Reduktion des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dabei wird das OPD oxidiert und bildet ein gelblich-braunes Reaktionsprodukt. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 25  $\mu$ l einer 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung pro Well gestoppt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen. Aus diesen Werten wurde mithilfe der Kalibrationskurve der Standardreihe die Konzentration des IL-6 im Zellüberstand berechnet. Dazu wurde das Programm SoftMax® Pro (Molecular Devices) verwendet.

## Methoden

	IL-6	IFN- $\alpha$	IL-1 $\beta$
Coating Antikörper	rat anti human IL6 [0,5 $\mu$ g/ml]	anti-human IFN- $\alpha$ Coating Antibody [0,1 $\mu$ g/ml]	anti-human IL-1 $\beta$ [0.5 $\mu$ g/ml]
Proben	10 $\mu$ l Überstand ad 50 $\mu$ l Blockpuffer	50 $\mu$ l Überstand	25 $\mu$ l Überstand ad 50 $\mu$ l Blockpuffer
1.Standard	recombinant human Interleukin 6 (rh IL-6) [10 ng/ml]	humanes IFN-alpha [4 ng/ml]	humanes IL-1 $\beta$ [2ng/ml]
Detektion Antikörper	biotinylated rat anti human IL6 [0,5 $\mu$ g/ml]	HRP-Conjugate anti- human IFN-alpha monoclonal antibody (1:1000)	Biotinylated goat anti human IL-1 $\beta$ [
Enzymkonjugat	Streptavidin-POD [0,1 U/ml]		Streptavidin-POD [0,1 U/ml]

### 5.3 Fluoreszenzfärbung

Die elutrierten humanen Monozyten wurden für die Fluoreszenzfärbungen in Teflongefäßen ausgesät und nach Stimulation bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Monozyten resuspendiert und in Facs-Röhrchen überführt. Nach dreimaligem Waschen mit 500 $\mu$ l PBS<sub>def</sub> (300xg, 4°C, 6 Minuten) wurden die Zellen mit 2%iger Paraformaldehyd-Lösung für 20 min bei RT fixiert. Paraformaldehyd führt zu einer Quervernetzung zellulärer Proteine, sodass die Zelle konserviert wird, ihre Struktur jedoch erhalten bleibt. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit 500  $\mu$ l PBS<sub>def</sub> gewaschen (300xg, 4°C, 6 Minuten) und bei 4°C über Nacht gelagert.

Es folgte die Permeabilisierung der Zellen mit 250 $\mu$ l Saponinpuffer pro Röhrchen, für eine Stunde bei Raumtemperatur. Für die Färbung wurden die Monozyten mit DAPI und Strep-Alexa594 bei einer Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur Inkubiert. DAPI und Strep-Alexa594 wurden dazu 1:1000 in Saponinpuffer verdünnt und 250 $\mu$ l pro Röhrchen pipettiert.

Es folgten 2 Waschschrte mit 500 $\mu$ l Saponinpuffer, sowie ein Waschschrte mit 200 $\mu$ l PBS<sub>def</sub> pro Röhrchen. Die Monozyten wurden dann in 200 $\mu$ l PBS<sub>def</sub> aufgenommen.

Anschließen wurden sie mithilfe der Zytospin auf einen Objektträger aufgetragen. Dazu wurden die Objektträger mit Filterpapieren und Trichtern auf Metallspangen geschraubt, die in die Zytospin eingesetzt wurden. Die Zellsuspension wurde komplett in einen Trichter gegeben und mit 3,5xg für 3 Minuten zentrifugiert. Die mit Zellen



beschichteten Objektträger wurden mit Roti®-Mount FluorCare eingedeckelt und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Die Aufnahme und Analyse der Fluoreszenzfärbung erfolgte mit dem einem konfokalem Laserscan Mikroskop „TCS Sp5“ (Leica).

## **5.4 Durchflussszytometrie**

Die Durchflussszytometrie (fluorescence-activated cell sorting; FACS), ist eine Methode zur Analyse von Zellen bezüglich ihrer Größe und Granularität. Durch die Markierung von Strukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen, ist zudem die Analyse von Oberflächeneigenschaften und intrazellulärer Zusammensetzung möglich. Die zu untersuchenden Zellen werden in einem laminaren Probestrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet und von einem Laserstrahl erfasst. Dadurch kommt es einerseits zur Lichtstreuung, sowie zur Emission von Licht einer spezifischen Wellenlänge durch den Fluoreszenzfarbstoff.

Durch das nach vorne gestreute Licht, ist die Bestimmung der Größe der gemessenen Zellen möglich (Forwardscatter; FSC). Das Seitwärtsstreulicht dient als Maß für die Zellgranularität (Sidescatter; SSC).

### **5.4.1 Probenvorbereitung für die Durchflussszytometrie**

Die Überstände wurden nach 22 Stunden abgenommen und die Zellen mit 200µl Lösepuffer pro Well versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen resuspendiert und die Doppelbestimmungen in Facs-Röhrchen vereint. Die Zellen wurden anschließend zwei Mal mit 1ml FACS-Puffer gewaschen (300x g, 7 Minuten, 4°C) und schließlich in 250µl FACS-Puffer aufgenommen.

Die Messung erfolgte mit dem „FACS Calibur“ Durchflussszytometer unter Verwendung der Software „CellQuest“ (BD). Anschließend wurden die Daten mit dem Auswertungsprogramm „FlowJo 8.1.1“ analysiert.

## **6 Ergebnisse**

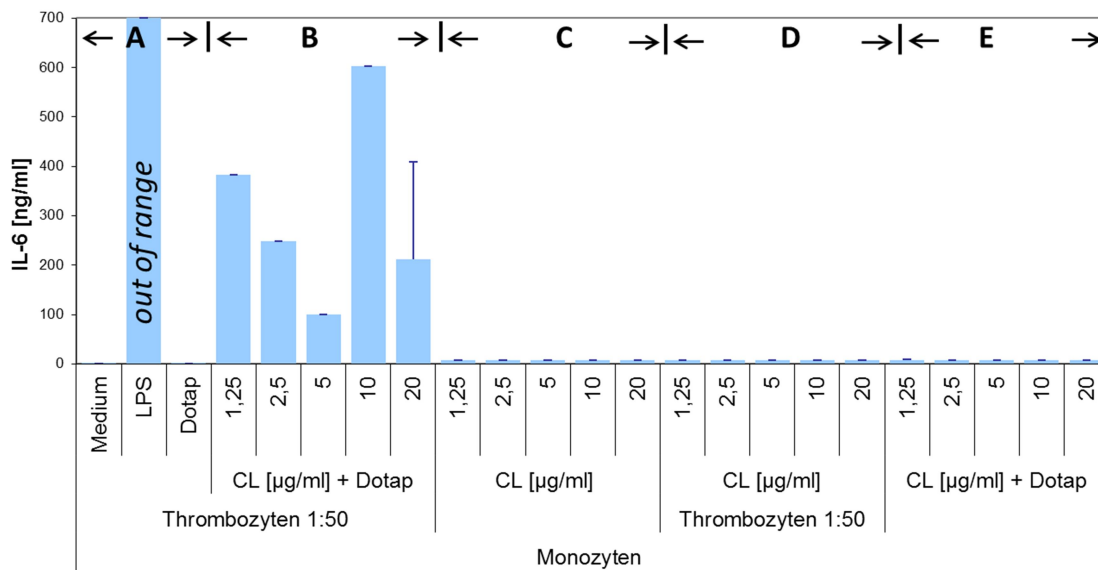
### **6.1 Cardiolipin in Kombination mit Thrombozyten und Dotap induziert die Freisetzung von IL-6 in humanen Monozyten.**

Versuche von Viktoria Laukemper haben gezeigt, dass neben Cardiolipin Thrombozyten und das Transfektionsreagenz Dotap als Kostimulatoren nötig sind, um eine IL-6-Antwort in humanen Monozyten zu induzieren (Laukemper, Masterarbeit).

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden humane Monozyten mit Cardiolipin in verschiedenen Konzentrationen, sowie mit Cardiolipin in Kombination mit Thrombozyten oder Dotap, oder mit Cardiolipin in Kombination mit beiden Kostimulatoren für 22h stimuliert (5.1.6.1) und die induzierte Immunaktivierung anschließend über die Messung der freigesetzten IL-6-Menge bestimmt.

Die Thrombozyten wurden den Monozyten im Verhältnis 50:1 zugesetzt, da im Vorfeld gezeigt wurde, dass so die maximale IL-6-Freisetzung erreicht wird (Laukemper, Masterarbeit).

Eine Stimulation der Monozyten mit Dotap und Thrombozyten ohne CL, sowie nur mit Medium und Thrombozyten diente als Negativkontrolle. LPS als Ligand des TLR-4 sollte als Positivkontrolle die Funktionalität der Zellen anzeigen. Die sezernierten IL-6-Mengen wurden mithilfe eines Sandwich-ELISAs nachgewiesen (5.2.3). Abbildung 7 zeigt exemplarisch das Ergebnis nach Stimulation mit Cardiolipin in den Konzentrationen 1,25; 2,5; 5; 10 und 20 µg/ml.



**Abbildung 7: Cardiolipin induzierte Freisetzung von IL-6 durch Monozyten in Kombination mit Thrombozyten und Dotap**

Humane Monozyten wurden in folgenden Kombinationen mit Cardiolipin stimuliert:

**B** Monozyten mit CL, Thrombozyten und Dotap, **C** Monozyten mit CL, **D** Monozyten mit Thrombozyten und CL, **E** Monozyten, Dotap und CL.

**A** Kontrollen: Das verwendete Medium mit Thrombozyten diente als Negativkontrolle. Die Stimulation durch Dotap wurde ausgeschlossen. LPS wurde als Positivkontrolle verwendet.

Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Versuche. Die Menge des freigesetzten IL-6 in den Zellüberständen wurde mithilfe eines humanen IL-6-ELISAs bestimmt.

CL in Kombination mit Dotap und Thrombozyten induzierte bei den Zellen, wie bereits in vorhergehenden Arbeiten gezeigt, die Sekretion von IL-6, während Dotap und Thrombozyten ohne Cardiolipin nicht zu einer IL-6 Ausschüttung führten. Auch führte die Stimulation der Monozyten mit CL in Kombination mit nur einem der beiden Kofaktoren nicht zu einer messbaren IL-6 Produktion. Die LPS-Stimulation führte zu einer IL-6-Ausschüttung durch die Monozyten, was ihre Funktionalität anzeigt.

Es konnte somit bestätigt werden, dass neben Cardiolipin sowohl Thrombozyten, als auch Dotap nötig sind, um eine IL-6 Ausschüttung zu stimulieren.

In weiteren Versuchen sollte nun untersucht werden, durch welchen Mechanismus Dotap zur Cardiolipin induzierten Stimulation von Monozyten beiträgt.

## 6.2 Untersuchungen zur Funktion von Dotap

### 6.2.1 Stimulation der humanen Monozyten mit komplexiertem Cardiolipin

Um durch Cardiolipin-Stimulation eine IL-6 Antwort zu induzieren, sind zudem Thrombozyten und das Transfektionsreagenz Dotap als Kostimulatoren nötig.

Thrombozyten bewirken durch einen ERK-aktivierenden Mechanismus eine Kostimulation der Monozyten (Laukemper, Masterarbeit).

Dotap ist ein kationischer Liposomen-formender Stoff, der zur Transfektion von DNA, RNA und anderen negativ geladenen Molekülen in Zellen genutzt wird. Er formt stabile Komplexe, die mit der Zellmembran fusionieren und ihren Inhalt in das Zytoplasma abgeben (Sigma-Aldrich). Es ließ sich daher vermuten, dass die Fähigkeit zur Komplexbildung von Dotap für die Aufnahme von Cardiolipin in die Zelle nötig ist, um eine IL-6-Sekretion zu induzieren.

In folgenden Versuchen wurde daher untersucht, ob eine Komplexbildung des Cardiolipins ausreicht, um die Phagozytose der Partikel zu induzieren, oder ein spezifisches Trägersystem, wie zum Beispiel Dotap nötig ist, um die Aufnahme von Cardiolipin in die Zelle zu vermitteln. Dotap wurde dazu durch Komplexbildende Substanzen ersetzt (5.1.6.1.1.); Zum einen wurden Komplexe aus biotinyliertem Cardiolipin und Streptavidin

gebildet. Streptavidin bindet mit hoher Affinität an Biotin, wodurch die Formierung der Komplexe zustande kommt (CHAIET und WOLF 1964).

Außerdem wurden Komplexe aus biotinyliertem Cardiolipin, Streptavidin und biotinylierter

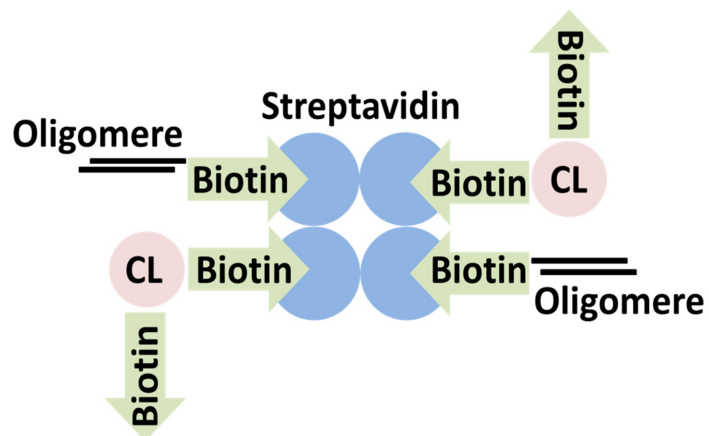


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Komplexe aus biotinyliertem Cardiolipin, Streptavidin und biotinylierten Oligomeren.

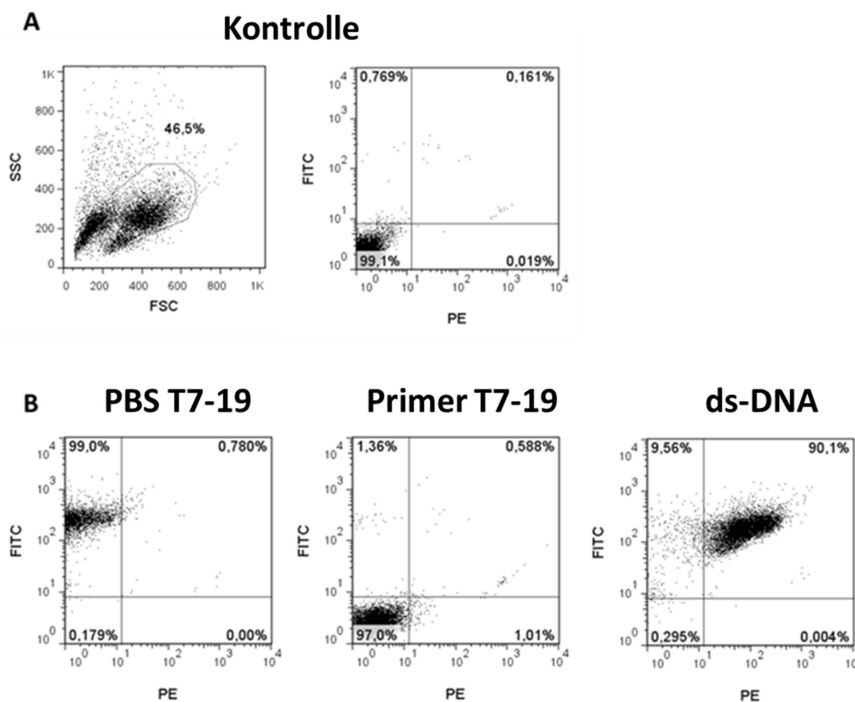
doppelsträngiger DNA (dsDNA) gebildet (siehe Abbildung 8). Die dsDNA bestand aus Oligomeren, welche komplementär zueinander waren und sollte spezifisch die Aufnahme der Komplexe in die Zelle bewirken. Dass Monozyten die dsDNA spezifisch aufnehmen, wurde im folgenden Versuch nachgewiesen.

#### 6.2.1.1 Humane Monozyten nehmen spezifisch doppelsträngige DNA auf

Um zu zeigen, dass die Monozyten spezifisch dsDNA aufnehmen, wurden humane Monozyten 22 h mit Fluoreszenz-markierten DNA-Oligomeren inkubiert (5.1.6.3), anschließend gewaschen (5.4.1) und per Durchflusszytometrie untersucht (5.4). Um eine unspezifische Stimulation der Monozyten durch die verwendeten Oligomere auszuschließen, wurden die sezernierten IL-6-Mengen der Zellkultur mithilfe eines Sandwich-ELISAs gemessen.

Da Nukleinsäuren Immunzellen typischerweise zur IFN- $\alpha$ - Sekretion anregen (Vollmer et al. 2004) wurde zudem die sezernierte IFN- $\alpha$ -Menge im Überstand per Sandwich-ELISA gemessen.

Um die Aufnahme der Oligomere in die humanen Monozyten per Durchflusszytometrie nachweisen zu können, wurden Fluoreszenz-markierte Oligomere verwendet. PBS T7-19 war FITC- und Primer T7-19 PE-markiert. PBS T7-19 und Primer T7-19 sind komplementär zueinander.

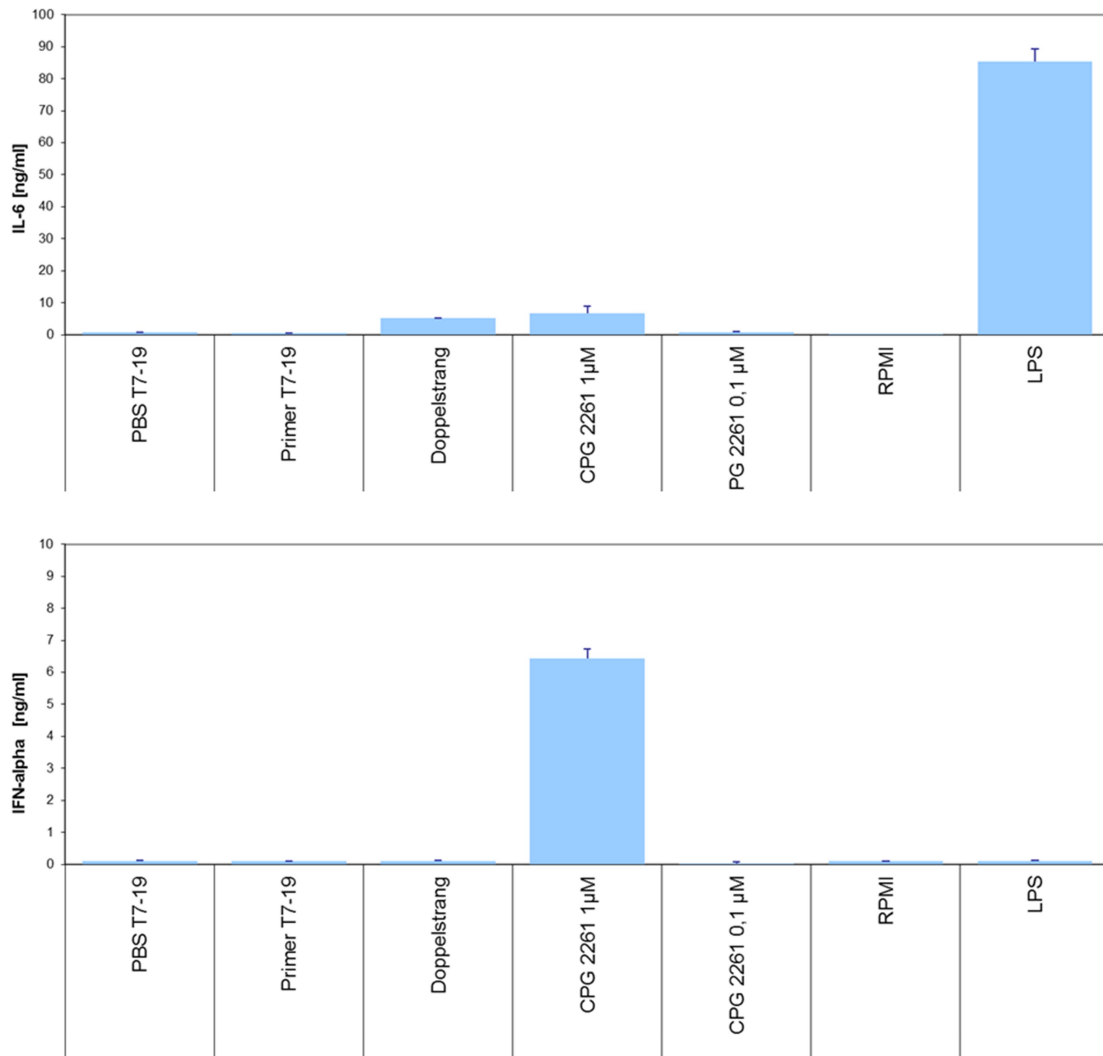


**Abbildung 9: Aufnahme der Oligomere.** **A** humane Monozyten anhand des Forward- und Sideward – Scatter identifiziert. Um die Monozyten Population ist zur weiteren Untersuchung ein Gate gelegt worden. **B** Oligomer-behandelte Monozyten. Durch Detektion der jeweiligen Markierung im PE- bzw. FITC- Kanal konnte die Aufnahme der Oligomere nachgewiesen werden.

Unbehandelte Zellen zeigen weder im FITC, noch im PE-Kanal ein detektierbares Signal (A). Da sich die Monozyten, die mit PBS T7-19 stimuliert wurden, FITC-positiv darstellen, lässt sich folgern, dass das PBS T7-19 in die Zellen aufgenommen wurde. Der PE-markierte Primer T7-19 hingegen, wurde nicht in die Monozyten aufgenommen, da sich die mit dem Primer T7-19 stimulierten Zellen als PE-negativ darstellen.

Werden jedoch humane Monozyten mit Doppelsträngen aus den komplementären Oligomeren PBS T7-19 und Primer T7-19 inkubiert, stellen sie sich in der Durchflusszytometrie doppelt positiv dar. Daher kann man folgern, dass Oligo-3 als Carrier für Oligo-8 dient.

Um eine Stimulation der Monozyten durch die verwendeten Oligomere auszuschließen, wurden die sezernierten IL-6- und IFN- $\alpha$ -Mengen der Zellkultur mithilfe eines Sandwich-ELISAs gemessen (Abbildung 10).



**Abbildung 10: IL-6 bzw. IFN- $\alpha$ -Freisetzung aus humanen Monozyten nach Inkubation mit einzelsträngigen Oligonukleotide, sowie doppelsträngiger DNA für 22h.**

Kontrollstimulation mit CPG 2216 in verschiedenen Konzentrationen, Medium und LPS. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Versuche. Die freigesetzte Zytokinmenge in den Zellüberständen wurde mithilfe eines ELISAs gemessen.

Die Stimualtion der Monozyten mit den Oligomeren führte zu keiner relevanten IL-6 Sekretion. Die Funktionalität der Monozyten wurde durch die LPS-Kontrolle überprüft. Auch führte die Stimulation der Monozyten mit den Oligomeren nicht zu keiner relevanten IFN- $\alpha$ -Produktion. Als positiv-Kontrolle diente hier das Oligomer CPG 2216. Es wurde somit verifiziert, dass die zusammengelagerten Oligomere PBS T7-19 und Primer T7-19 spezifisch in die Monozyten aufgenommen werden, jedoch selbst nicht stimulatorisch wirken.

### 6.2.1.2 Komplextiertes Cardiolipin wirkt nicht stimulatorisch

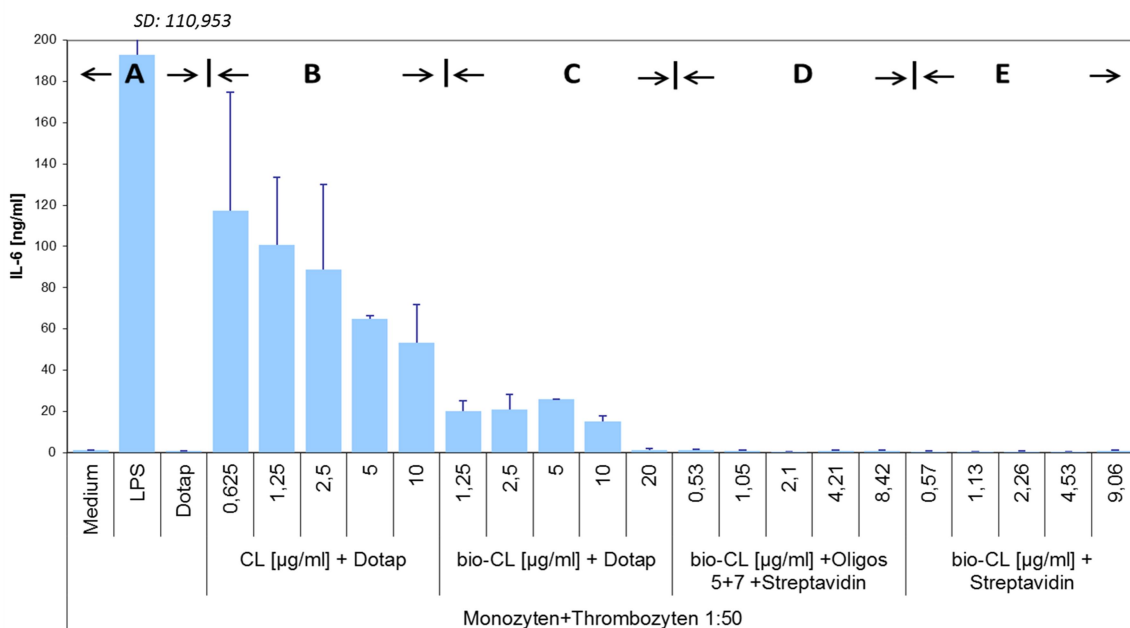
Um zu überprüfen, ob das Transfektionsreagenz Dotap die Aufnahme des Cardiolipins in die Zellen vermittelt, wurde Dotap im folgenden Versuch durch andere Komplexierung des Cardiolipins ersetzt (siehe 6.2.1).

Es wurden zum einen Komplexe aus biotinyliertem Cardiolipin und Streptavidin gebildet.

Außerdem wurden Komplexe aus biotinyliertem Cardiolipin, Streptavidin und biotinylierter doppelsträngiger DNA gebildet, die eine spezifische Aufnahme des Cardiolipins in die Zellen vermitteln sollte (siehe Abbildung 8).

Die Oligomere, die genutzt wurden um Komplexe zu bilden, waren nicht fluoreszenzmarkiert. Stattdessen trug Oligomer PBS T7-19 einen Biotin-Rest, der für die Bindung der Oligomere an das Streptavidin nötig war (siehe Abbildung 8).

Die Abbildung 11 zeigt exemplarisch das Ergebnis nach Stimulation der Monozyten mit den verschiedenen Cardiolipin- Komplexen. Die sezernierte IL-6-Menge wurde mit einem Sandwich-Elisa gemessen.



**Abbildung 11: Stimulation humaner Monozyten mit verschieden komplexiertem Cardiolipin. B** Stimulation der humanen Monozyten mit Cardiolipin in verschiedenen Konzentrationen, Dotap und Thrombozyten. **C** Stimulation mit biotinylierten Cardiolipin in verschiedenen Konzentrationen, Dotap und Thrombozyten. **D** Stimulation mit Komplexen aus biotinyliertem Cardiolipin in verschiedenen Konzentrationen, Oligomeren und Streptavidin. **E** Stimulation mit Komplexen aus biotinyliertem Cardiolipin in verschiedenen Konzentrationen und Streptavidin. **A** Das verwendete Medium inklusive Thrombozyten mit und ohne Dotap diente als Negativkontrolle. LPS zeigte die Funktionalität der Monozyten an. Die Ergebnisse sind repräsentativ für sieben voneinander unabhängige Versuche. Die Menge des freigesetzten IL-6 in den Zellüberständen wurde mithilfe eines humanen IL-6-ELISAs ermittelt.

Mit der Stimulation der humanen Monozyten mit Komplexen aus biotinyliertem Cardiolipin und Streptavidin (D) sollte überprüft werden, ob eine Komplexierung ausreicht, um das Cardiolipin in die Zelle zu schleusen.

Die Stimulation der Monozyten mit Komplexen aus biotinyliertem Cardiolipin, Streptavidin und Oligomeren (C) sollte zeigen, ob ein spezifisches Trägersystem nötig ist, damit das Cardiolipin in die Zelle aufgenommen werden kann. Dass humane Monozyten die Oligomere aufnehmen wurde im Vorversuch gesichert.

Die Monozyten reagierten jedoch nach keiner der Komplex- Stimulationen mit einer Interleukin-Sekretion.

Zur Kontrolle wurden die Monozyten zudem mit Thrombozyten, Dotap und sowohl mit biotinyliertem Cardiolipin (B) als auch mit Cardiolipin ohne Biotin-markierung (A) stimuliert. In beiden Ansätzen konnte, wie erwartet, eine Interleukin-Sekretion nachgewiesen werden. Die Funktionalität der Monozyten wurde zudem durch die LPS-Kontrolle bestätigt.

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die verwendete Komplexierung des Cardiolipins kein Ersatz für Dotap ist.

### **6.2.2 Stimulatorisches Potential von Cardiolipin abhängig von Zeitintervall zwischen Dotap- und Cardiolipin- Zugabe**

Um die Rolle des Dotaps weiterhin zu untersuchen, wurden humane Monozyten zeitversetzt mit Dotap und Cardiolipin stimuliert.

Unter der Annahme, dass das Transfektionsreagenz Dotap für die Aufnahme des Cardiolipins in Monozyten nötig ist, würde eine Vorinkubation der Monozyten mit Dotap und einer nachfolgenden Cardiolipin-Stimulation dazu führen, dass das Dotap während der Vorinkubation in die Zelle aufgenommen wird und anschließend nicht mehr als Transporter für das Cardiolipin zur Verfügung steht. Demzufolge würde man bei einem solchen Versuchskonstellation nicht mit einer IL-6-Produktion rechnen.

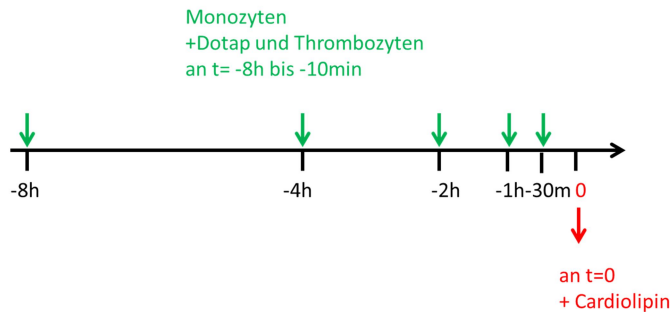
Umgekehrt würde eine Vorinkubation der Monozyten mit Cardiolipin und einer anschließenden Stimulation mit Dotap dazu führen, dass das Cardiolipin im Medium verbleibt, bis das Dotap hinzugegeben wird. Es wäre also zu erwarten, dass man unabhängig von der Dauer der Vorinkubation eine stabile IL-6-Sekretion induziert.

Die Monozyten wurden in diesem Versuch entweder 8 h; 4 h; 2 h; 1 h; 30 min und 10 min mit entweder Cardiolipin oder Dotap sowie 5 Mio. Thrombozyten in einem Volumen von 50 µl pro Well vorinkubiert, bevor Dotap oder Cardiolipin hinzugefügt wurden. Die Inkubationszeit betrug 22 Stunden ab Stimulation mit dem ersten Reagenz. So war der Inkubationszeitraum aller Monozyten mit dem Reagenz, das jeweils zum Vorinkubieren



genutzt wurde, gleich. Der Ablauf der Kinetik ist zur Verdeutlichung in Abbildung 12 dargestellt.

## Vorinkubation der Monozyten mit Dotap



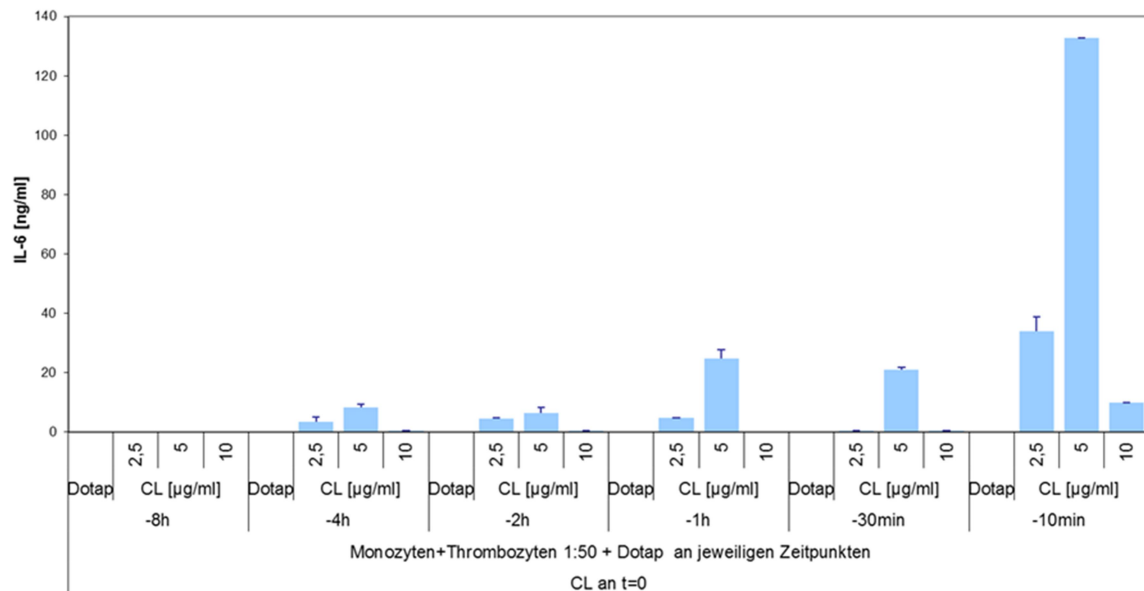
## Abnahme der Überstände

Jeweils 22 Stunden nach Beginn der Inkubation der Monozyten mit Dotap  
(also bei t=-8h+22h; t=-4h+22h usw.)

## **Abbildung 12: Ablaufschema des Kinetik-Versuchs**

Es wurden zu jedem Zeitpunkt drei verschiedenen Cardiolipin-Konzentrationen verwendet.

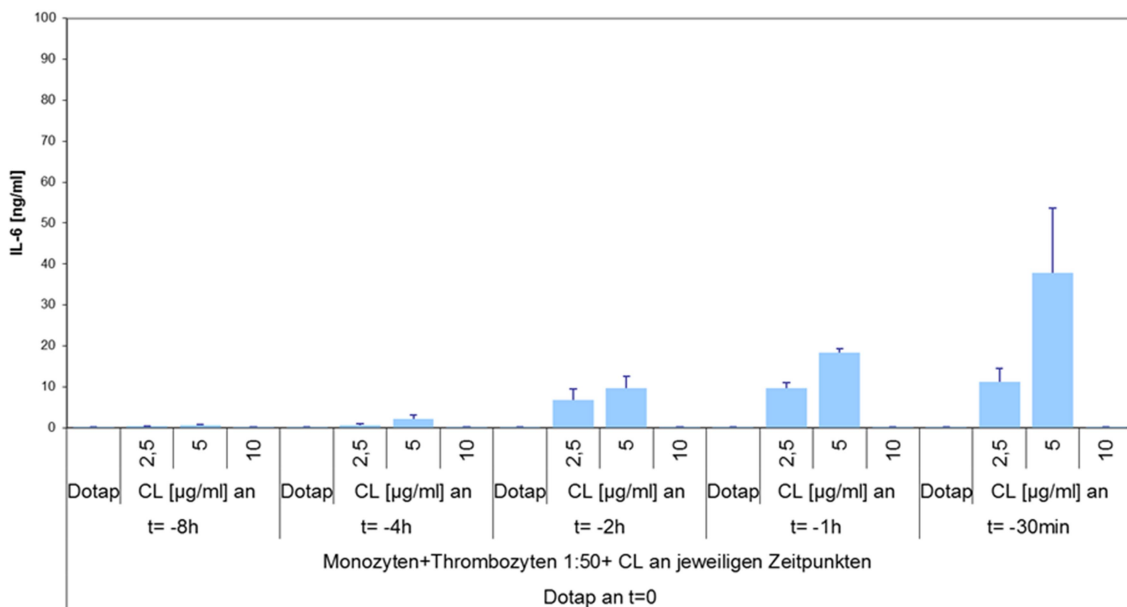
Im ersten Versuchsteil wurden die Zellen mit Dotap und Thrombozyten vorinkubiert und an den entsprechenden Zeitpunkten mit Cardiolipin versetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt:



**Abbildung 13: Vorinkubation der humanen Monozyten mit Dotap und Thrombozyten. -8 h** achtstündige Vorinkubation. **-4 h** vierstündige Vorinkubation. **-2 h** zweistündige Vorinkubation. **-1 h** einstündige Vorinkubation. **-30 min** 30 minütige Vorinkubation. **-10 min** 10 minütige Vorinkubation. Zum Zeitpunkt t=0 wurde Cardiolipin hinzugefügt. Die Abnahme der Überstände erfolgte jeweils 22 Stunden nach Zugabe von Dotap. Zu jedem Zeitpunkt wurde das verwendete Medium mit Dotap als Negativkontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier voneinander unabhängige Versuche. Die Menge des freigesetzten IL-6 in den Zellüberständen wurde mithilfe eines humanen IL-6-ELISAs bestimmt

Bei der Vorinkubation der Monozyten mit Dotap steigt die IL-6-Produktion der Monozyten, wie erwartet, mit Verkürzung der Vorinkubationszeit. So sieht man bei der Stimulation der Monozyten mit Cardiolipin, acht Stunden nach der Zugabe von Dotap, keine IL-6 Produktion. Liegen die Zeitpunkte der Dotap und Cardiolipin-Addition nur 10 Minuten auseinander; ist die IL-6-Produktion am höchsten. Dieses Ergebnis spricht für die Theorie, dass das Dotap für die Aufnahme des Cardiolipins in die Zelle nötig ist.

In einem homologen Versuchsaufbau wurden die Monozyten mit Cardiolipin und Thrombozyten vorinkubiert und anschließend zum Zeitpunkt t=0 mit Dotap versetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14: Vorinkubation der humanen Monozyten mit Cardiolipin und Thrombozyten.** -8 h achtsündige Vorinkubation. -4 h vierstündige Vorinkubation. -2 h: zweistündige Vorinkubation. -1 h einstündige Vorinkubation. -30 min 30 minütige Vorinkubation. Zum Zeitpunkt t=0 wurde Dotap hinzugefügt. Die Abnahme der Überstände erfolgte jeweils 22 Stunden nach Zugabe von Cardiolipin. Zu jedem Zeitpunkt wurde das verwendete Medium mit Dotap als Negativkontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier voneinander unabhängige Versuche. Die Menge des freigesetzten IL-6 in den Zellüberständen wurde mithilfe eines humanen IL-6-ELISAs bestimmt.

Entgegen der Erwartung steigt bei der Vorinkubation der Monozyten mit Cardiolipin die IL-6-Produktion, mit Verkürzung der Vorinkubationszeit. Liegen die Dotap- und Cardiolipin-Stimulation acht Stunden auseinander, kommt es zu keiner IL-6 Produktion. Liegen die Zeitpunkte der Dotap und Cardiolipin-Zugabe hingegen nur 30 Minuten auseinander; ist die IL-6-Produktion am höchsten. Dieses Ergebnis spricht gegen die These, dass Cardiolipin während der Vorinkubation im Medium verbleibt, bis das Dotap

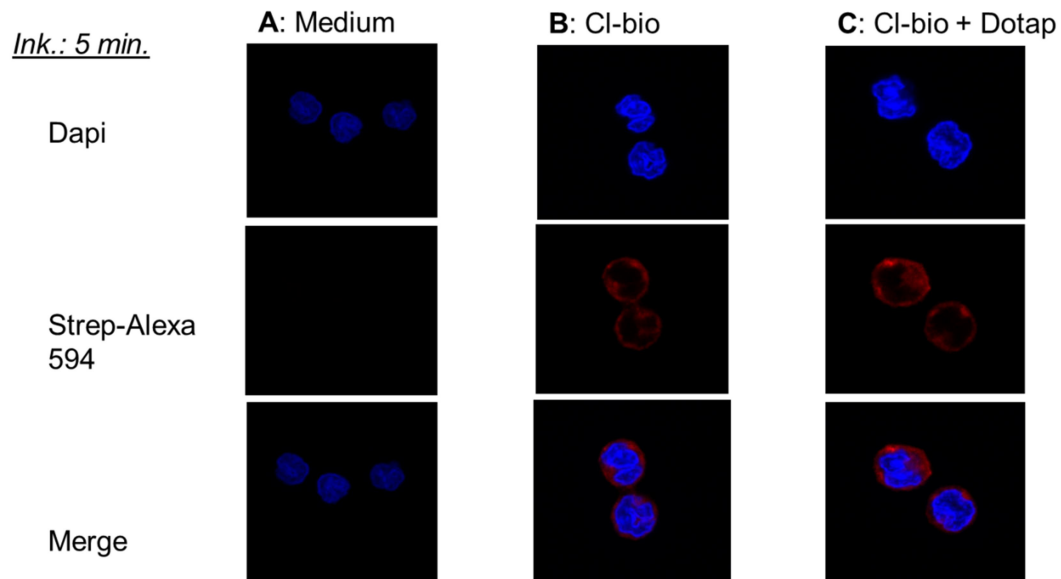
hinzugefügt wird und dann zusammen mit dem Dotap aufgenommen wird. Die Abhängigkeit der IL-6-Produktion vom Zeitintervall zwischen Cardiolipin- und Dotap-Zugabe deutet daraufhin, dass das Dotap nicht zur Aufnahme des Cardiolipins in die Zelle nötig ist. Aus diesen Ergebnissen wurde die Annahme entwickelt, dass Cardiolipin und Dotap jeweils separate Signalwege induzieren, die sich zeitlich überschneiden müssen, um zur IL-6-Produktion zu führen.

### **6.2.3 Die Aufnahme von Cardiolipin in humane Monozyten erfolgt Dotap-unabhängig**

Um die Vermutung, dass das Dotap kein Transportsystem für das Cardiolipin in die Zelle darstellt, zu verifizieren, sollte durch eine Fluoreszenzfärbung gezeigt werden, dass Cardiolipin ohne Dotap in die Zellen aufgenommen wird. Dazu wurden die Zellen entweder mit biotinyliertem Cardiolipin alleine oder mit biotinyliertem Cardiolipin zusammen mit Dotap inkubiert (5.1.6.3) und anschließend über die Anfärbung mittels Strep-Alexa 594 und Dapi detektiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass biotinyliertes Cardiolipin, genauso wie Cardiolipin, in den entsprechenden Rahmenbedingungen stimulatorisch auf humane Monozyten wirkt und daher ersatzweise genutzt werden kann (siehe Abbildung 11). Für den Nachweis wurde das biotinylierte Cardiolipin über Streptavidin-Alexa 594-Komplexe detektiert.

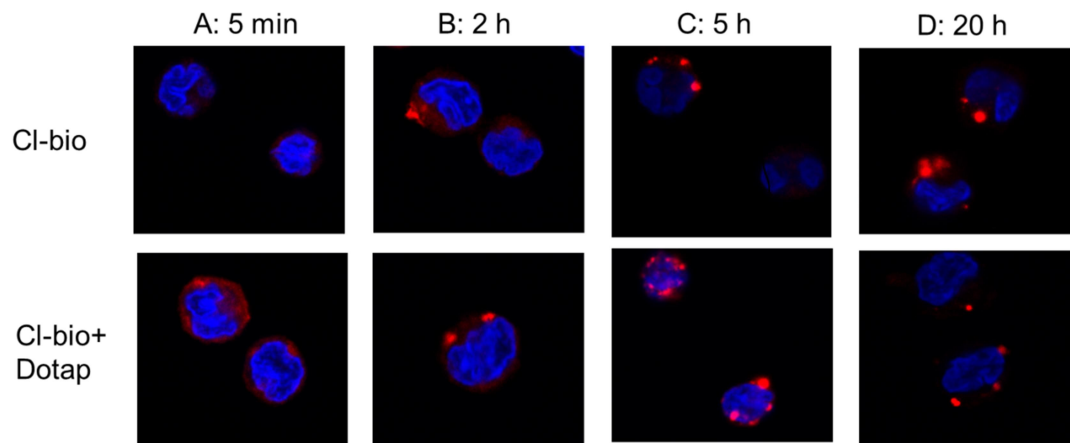
Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscan Mikroskop aufgenommen.



**Abbildung 15:** Humane Monozyten wurden für fünf Minuten mit biotinyliertem Cardiolipin alleine (**B**), oder mit biotinyliertem Cardiolipin in Kombination mit Dotap stimuliert (**C**) und anschließend mit Strep-Alexa und Dapi gefärbt. Cardiolipin tritt sowohl alleine als auch in Kombination mit Dotap, in die Zelle ein. Als Negativkontrolle wurden Monozyten fünf Minuten im verwendeten Medium inkubiert (**A**). Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscan Mikroskop aufgenommen.

Es lässt sich darstellen, dass Cardiolipin sowohl mit (**C**), als auch ohne Dotap (**B**) bereits nach fünf Minuten in die Zelle aufgenommen wird.

Um die Verteilung und Lokalisation des Cardiolipins näher zu untersuchen, wurden die Zellen unterschiedlich lange mit entweder biotinyliertem Cardiolipin alleine oder in Kombination mit Dotap inkubiert. Der Stimulationszeitraum betrug jeweils 5 Minuten, 2 Stunden, 5 Stunden und 20 Stunden:



**Abbildung 16: Aufnahme und Lokalisation des Cardiolipins Abhängig von der Inkubationszeit.** Humane Monozyten wurden für unterschiedliche Zeiträume (**A-D**) mit biotinyliertem Cardiolipin alleine oder in Kombination mit Dotap stimuliert. Cardiolipin wird sowohl mit, als auch ohne Dotap, in die Zellen aufgenommen. Bereits nach 2 Stunden lässt sich beobachten, dass das Cardiolipin innerhalb der Zellen Vesikel formt (**B-D**).

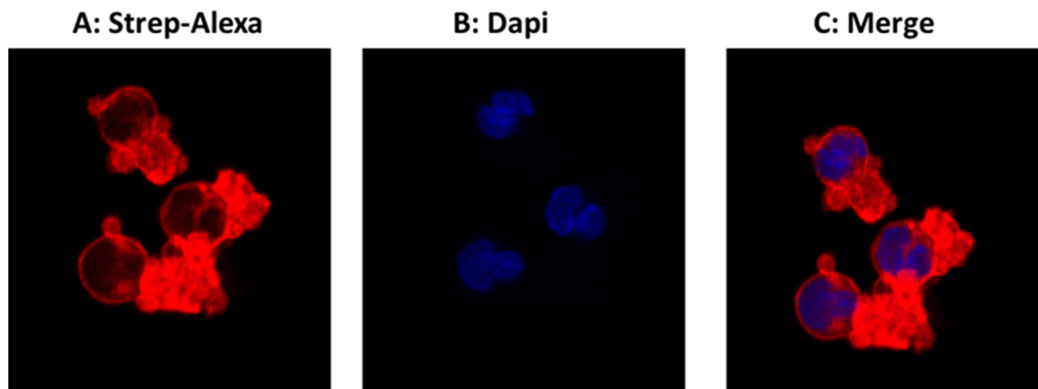
Hier wurde die Dynamik von Cardiolipin in der Zelle untersucht. Innerhalb der Zelle formt das Cardiolipin bereits nach zwei Stunden partikuläre Strukturen. Dies lässt sich sowohl mit als auch ohne Dotap-Kostimulation beobachten.

Auch in diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, dass das Dotap nicht für die Aufnahme des Cardiolipins in die Zelle nötig ist, sondern das Cardiolipin auch ohne Dotap in die Zelle aufgenommen wird. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass das Dotap und Cardiolipin jeweils separate Signalwege induzieren. Die Wirkung des Dotap wurde in den nächsten Versuchen näher untersucht.

### 6.3 Thrombozyten lagern sich an Monozyten an

Viktoria Laukemper hat in ihrer Masterarbeit unter anderem die Interaktion zwischen Monozyten und Thrombozyten untersucht. Es wurde die These entwickelt, dass Thrombozyten durch direkte Interaktion mit den Monozyten über Oberflächenmoleküle zu deren Aktivierung beitragen. Dies konnte jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Während der Arbeit an den Fluoreszenzfärbungen, bei der zusätzlich zu Cardiolipin und Dotap auch Thrombozyten im Stimulationsansatz vorhanden waren, konnte beobachtet werden, dass auch die Thrombozyten Cardiolipin aufnehmen. Dadurch konnten die Thrombozyten ebenfalls im Laserscan-Mikroskop dargestellt werden. Es war feststellbar, dass sich die Thrombozyten an die Monozyten anlagern (siehe Abbildung 17)



**Abbildung 17:** Humane Monozyten wurden für 2 Stunden mit biotinyliertem Cardiolipin, Dotap und Thrombozyten stimuliert und anschließend mit Strep-Alexa und Dapi gefärbt. Cardiolipin wird von Monozyten, als auch von Thrombozyten aufgenommen. Die Thrombozyten lagern sich den Monozyten an.

## 6.4 Untersuchung der ERK-Aktivierung nach Stimulation der humanen Monozyten

Yan et al. konnten zeigen, dass Dotap in Immunzellen die ERK-Phosphorylierung induziert (Yan et al. 2007). Dadurch ließ sich vermuten, dass Dotap, wie die Thrombozyten, durch eine Induktion des ERK-Signalweges zu einer IL-6-Produktion führt.

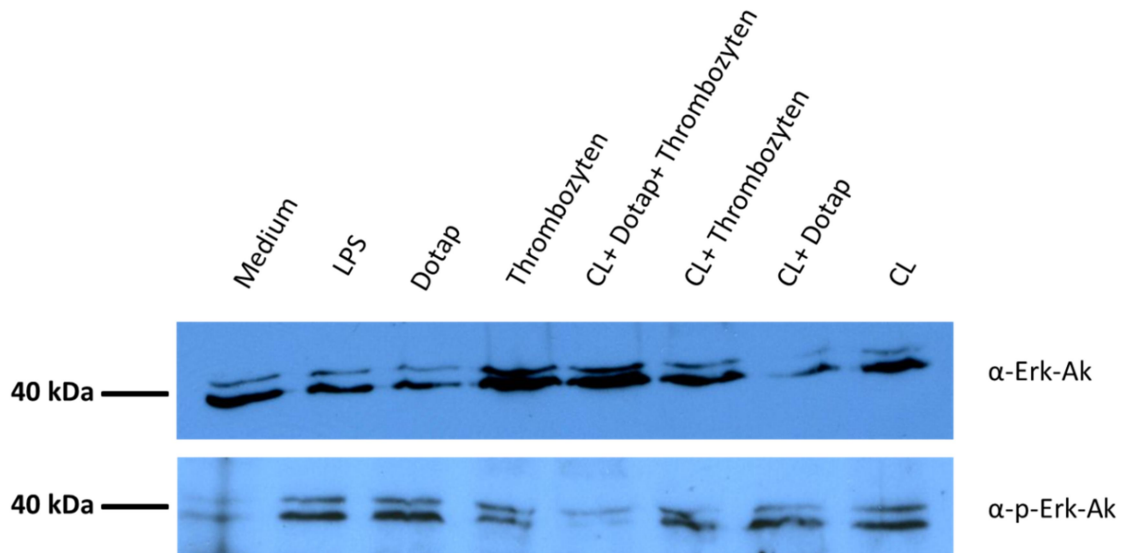
ERK wird zunächst an Tyrosin phosphoryliert, bevor Threonin phosphoryliert wird. Die an Tyrosin phosphorylierten Proteine sind nicht aktiv, sondern müssen akkumulieren, bevor sie an Threonin phosphoryliert werden. Wenn dieser „Akkumulations-Schwellenwert“ erreicht ist, werden die Kinasen schnell in das aktive Stadium konvertiert, sobald Threonin phosphoryliert wird (Pearson et al. 2001).

Es wurde daher die These entwickelt, dass zunächst eine bestimmte Menge an, an Tyrosin phosphorylierten ERK, in der Zelle akkumulieren muss, bevor nach weiterer Stimulation ERK an Threonin phosphoryliert wird, um eine Antwort zu induzieren und eine IL-6-Produktion auszulösen.

In diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob die Dotap-induzierte Aktivierung des ERK-Signalweges für die IL-6-Freisetzung in Monozyten als Reaktion auf CL nötig ist. Die Menge des phosphorylierten ERKs (p-ERK) wurde dazu per Western-Blot analysiert.

Humane Monozyten wurden mit Dotap, Thrombozyten und Cardiolipin in unterschiedlichen Kombinationen stimuliert und anschließend lysiert (5.1.6.4). Die Monozytenlysate wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit ERK und p-ERK spezifischen Antikörpern analysiert (siehe Abbildung 18). Dafür wurde in jede Tasche des Gels die gleiche Menge an Lysat aufgetragen. Der Blot zeigt

Isoformen von ERK bzw. p-ERK in der Höhe von etwa 42/44 kDa. Der ERK Western-Blot diente dabei als indirekte Ladekontrolle, da eine Ladekontrolle mittels Aktin, aufgrund der Verwendung von Thrombozyten als Stimulus, nicht möglich war.



**Abbildung 18: Nachweis der Expression von ERK/p-ERK im Western Blot.** Das Zelllysate der Medium-behandelten Monozyten diente als Negativkontrolle, das, der mit LPS behandelten Zellen als Positivkontrolle. Dieses Ergebnis ist repräsentativ für fünf voneinander unabhängige Versuche.

Die Proben, welche keine Thrombozyten enthielten, zeigen im ERK-Western-Blot eine relativ gleichmäßige Verteilung der Banden. Die Banden der Proben, welche Thrombozyten enthielten, waren im Gegensatz dazu stärker.

Der p-ERK Western-Blot zeigt die Induktion des p-ERK-Signalweges an. Die Negativ-Kontrolle zeigt eine schwache Bande. LPS diente als starker ERK-Aktivator als Positiv-Kontrolle.

Die verschiedenen Stimulationsansätze führen zu einer relativ gleichmäßigen Induktion des ERK-Signalweges, außer in der Stimulation mit Cardiolipin, Dotap und Thrombozyten.

Entgegen der Erwartung sieht man bei dieser Stimulation schwächere Banden, als bei den restlichen Stimulationen. Diese Doppelbande ist vergleichbar mit der Negativ-Kontrolle.

Es ließ sich in diesem Versuch daher nicht nachweisen, dass Dotap durch die Induktion der ERK-Phosphorylierung zu einer IL-6 Produktion führt.

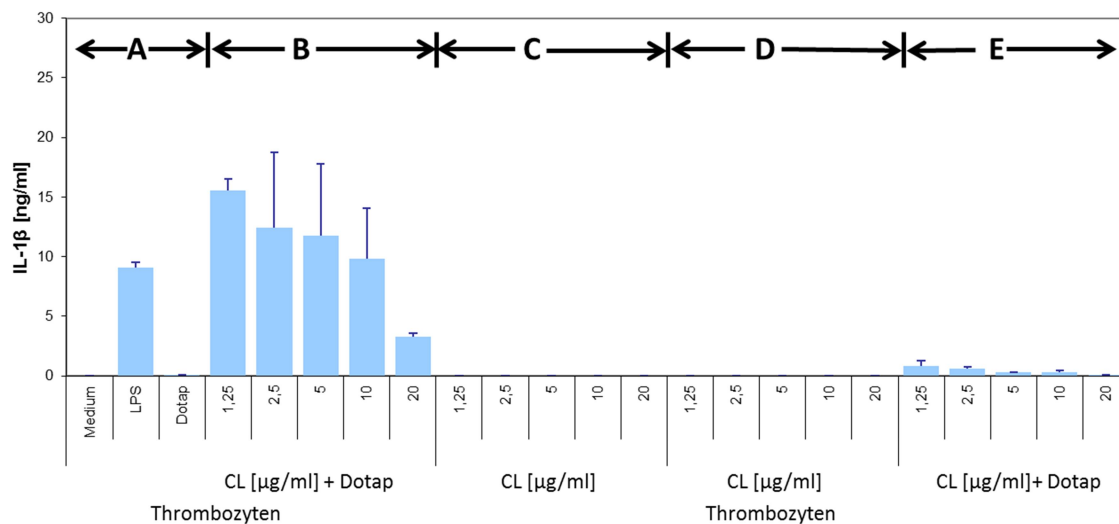
## 6.5 Beteiligung des Inflammasoms

Lyer et al. konnten zeigen, dass nach Stimulierung LPS-vorbehandelter Makrophagen mit Linezolid, mitochondriales Cardiolipin durch direkte Bindung das Nlrp-3 Inflammasom aktiviert und so zu einer IL-1 $\beta$ -Sekretion führt (Lyer et al. 2013).

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte in weiteren Versuchen untersucht werden, ob das Cardiolipin über eine Inflammasom-Aktivierung zu einer Zytokinausschüttung führt. Um die IL-1 $\beta$ -Ausschüttung stimulierter Monozyten zu untersuchen, wurde ein IL-1 $\beta$ -ELISA durchgeführt. In humanen Monozyten ist kein LPS-priming nötig, um die Caspase 1 zu induzieren, da sie in diesen Zellen konstitutiv exprimiert wird (Martinon et al. 2002).

Die humanen Monozyten wurden daher direkt mit Cardiolipin, Thrombozyten und Dotap stimuliert. Ausgehend von den Ergebnissen von Lyer et al. wäre zu erwarten, dass Cardiolipin alleine ausreicht, über eine Nlrp-3 Inflammasom-aktivierung IL-1 $\beta$  zu induzieren.

Abbildung 19 zeigt exemplarisch das Ergebnis des IL-1 $\beta$ -Elisas nach Stimulation der humanen Monozyten mit Cardiolipin, Dotap und Thrombozyten in verschiedenen Kombinationen:



**Abbildung 19:** Stimulation humaner Monozyten mit Cardiolipin, Thrombozyten und Dotap in verschiedenen Kombinationen **A** Kontrollstimulation mit Medium, Thrombozyten, LPS und Dotap **B** Stimulation mit Thrombozyten, Cardiolipin in verschiedenen Konzentrationen und Dotap **C** Stimulation mit Cardiolipin in verschiedenen Konzentrationen **D** Stimulation mit Cardiolipin in verschiedenen Konzentrationen und Thrombozyten **E** Stimulation mit Cardiolipin in verschiedenen Konzentrationen und Dotap. Die produzierte IL-1 $\beta$ -Menge wurde mit einem ELISA ermittelt. Dieses Ergebnis ist repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Versuche.



Die Monozyten reagieren auf die alleinige Stimulation mit Cardiolipin nicht mit einer IL-1 $\beta$ -Ausschüttung (**C**). Sind hingegen alle drei Komponenten im Stimulationsansatz vorhanden kommt es zu einer messbaren IL-1 $\beta$ -Produktion (**B**).

In diesem Versuch konnte nicht gezeigt werden, dass Cardiolipin über eine Inflammasom-Aktivierung zu einer Zytokin-Produktion führt, jedoch sind die Kofaktoren Dotap und Thrombozyten notwendig.

## 7 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die immunstimulatorischen Fähigkeiten des Phospholipids Cardiolipin untersucht. Cardiolipin kommt in der inneren Mitochondrienmembran eukaryotischer Zellen sowie in der Membran von Bakterien vor (Schlame et al. 2000). Die wesentliche Funktion des Cardiolipins ist die Beteiligung an der oxidativen Phosphorylierung, wo es den Protonentransport vermittelt (Haines und Dencher 2002). Eine weitere Funktion des Cardiolipins ist die Initiation von Apoptoseprozessen (Gomez und Robinson 1999). Cardiolipin wird auch im Zusammenhang mit dem Immunsystem gesehen. Zum Beispiel dient es als Epitop beim Nachweis von Cardiolipin Antikörpern im Rahmen der Diagnose des Antiphospholipidsyndroms (Giannakopoulos et al. 2009). Diese Antikörper gegen Cardiolipin verursachen venöse und arterielle Thromben und sind zudem bekannt, eine wichtige Rolle in der Pathogenese rheumatischer Erkrankungen, wie Lupus Erythematoses, zu spielen (Frostegård 2005).

Zudem externalisieren manche Bakterien, wie Salmonellen, während Infektionen Cardiolipin in ihre äußere Membran, vermutlich um die Resistenz gegen antimikrobielle kationische Peptide des Wirts (host cationic antimicrobial peptides=CAMPs) zu vermitteln (Dalebroux et al. 2014). Aufgrund der Forschungslage ist anzunehmen, dass Cardiolipin ein Antigen ist, welches durch pro-entzündliche Eigenschaften Immunantworten immunkompetenter Zellen generiert (Wan et al. 2014).

Viktoria Laukemper konnte zeigen, dass Cardiolipin die Produktion von Zytokinen, wie CCL5, TNF, CCL3, CCL1 und IL-6 in humanen Monozyten bewirkt (Laukemper, persönliche Mitteilung). IL-6 ist ein glykosyliertes Protein, welches von vielen Zelltypen synthetisiert und sekretiert wird, darunter Monozyten, T-Zellen, Fibroblasten und Endothel-Zellen (Yamasaki et al. 1988). Es ist ein proinflammatorisches Zytokin, das nach Bindung an den IL-6-R die angeborene und erworbene Immunität koordiniert (Bettelli et al. 2006). Unter anderem bewirkt IL-6 die Rekrutierung mononuklearer Zellen, inhibiert die T-Zell-Apoptose sowie die T<sub>reg</sub>-Differenzierung (Schaper und Rose-John 2015). Daher sind erhöhte IL-6-Spiegel in nahezu allen infektiösen und inflammatorischen Zuständen sowie im arteriosklerotischem Geschehen zu finden (Yudkin et al. 2000). Die Produktion von IL-6 durch humane Monozyten nach Stimulation mit Cardiolipin beweist somit, dass Cardiolipin immunstimulatorische Eigenschaften aufweist. In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus untersucht, durch den Cardiolipin die Monozyten zu einer Zytokin-Produktion anregt.

## 7.1 IL-Induktion durch Cardiolipin in humanen Monozyten

Zu Beginn der Arbeit wurden humane Monozyten mit Cardiolipin in Kombination mit Dotap und Thrombozyten stimuliert und der Überstand mittels ELISA-Technik untersucht (siehe 6.1), um die Ergebnisse von Viktoria Laukemper zu verifizieren. Es wurde eine deutliche IL-6-Ausschüttung gemessen (siehe Abbildung 7). Damit konnte bestätigt werden, dass Cardiolipin humane Monozyten zu einer Zytokin Produktion anregt. Allerdings werden in dieser Situation Thrombozyten und Dotap als Kofaktoren benötigt, um die IL-6 Produktion durch Cardiolipin zu induzieren. In Kontrollen wurde bestätigt, dass weder Dotap mit Cardiolipin, noch Thrombozyten mit Cardiolipin, zu einer IL-6 Produktion führen. Es konnte damit gezeigt werden, dass Cardiolipin pro-inflammatorische Eigenschaften hat.

Durch den hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren ist Cardiolipin sehr anfällig für oxidative Modifikation (Li et al. 2015). Es wird vermutet, dass dieses oxidierte Cardiolipin (oxCL) immunstimulatorisch wirkt (Wan et al. 2014). Von oxidierten Phospholipiden ist bekannt, dass sie proinflammatorische Effekte haben, indem sie die Produktion inflammatorischer Zytokine steigern, sowie die Zelladhäsion, -migration, -proliferation, -apoptose, und -nekrose, vor allem in Endothelzellen, Makrophagen, und glatten Muskelzellen. Im Kontext des Antiphospholipidsyndroms (APS) und systemischen Lupus Erythematoses (SLE), erkennen kreuzreaktive Antikörper sowohl Cardiolipin als auch oxidierte Phospholipide, was eine Assoziation zwischen Lipid-Peroxidation und Antiphospholipid-Antikörpern impliziert (Froestegård 2005). Phospholipide sind empfindlich gegenüber Peroxidation durch freie Radikale. Dadurch entstehen oxidierte Phospholipide vermehrt im Rahmen entzündlicher Prozesse, da aktivierte Phagozyten unter anderem reaktive Sauerstoff-Spezies bilden. Daher sind sie bei vielen inflammatorischen Erkrankungen zu finden, wie Arteriosklerose, Parkinson, Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis, Diabetes und systemischen Lupus Erythematoses (Greig et al. 2012).

Wan et al. konnten zeigen, dass oxCL polymorphonukleäre Leukozyten und Monozyten zur Leukotrien B<sub>4</sub>-Produktion anregt. Leukotriene sind ebenfalls proinflammatorische Moleküle, die im Rahmen der angeborenen Immunantwort ausgeschüttet werden (Wan et al. 2007) und eine Rolle bei der Pathogenese der Arteriosklerose spielen (Helgadóttir et al. 2004). Es wurde bisher nicht untersucht, durch welchen Mechanismus und Rezeptor oxCL die hier beschriebenen proinflammatorischen Effekte ausübt. Es kann mit verschiedenen Rezeptoren interagieren, wie mit dem Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPAR), dem Plättchen aktivierenden Faktor (PAF) oder mit Toll-like-Rezeptoren (TLRs) (Greig et al. 2012). Es stellt sich daher die Frage, ob Cardiolipin aufgrund seiner phylogenetischen

Herkunft im nativen Zustand vom Immunsystem als PAMP erkannt wird oder ob eine Oxidation vorausgehen muss.

Durch die Anfälligkeit des Cardiolipins gegenüber oxidativer Modifikation, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Cardiolipin in den Versuchen dieser Arbeit bereits in oxidiert Form vorliegt. Es ist zudem möglich, dass CL in der Zelle oxidiert wird. Um die Ergebnisse mit denen von Wan et al. direkt vergleichen zu können, müsste dies jedoch überprüft werden. Alternativ könnte man den beschriebenen Versuch mit vorher oxidiertem Cardiolipin wiederholen. Die Methode der Cardiolipin-Oxidation würde dann von Wan et al. übernommen werden. Dies soll Teil zukünftiger Versuche sein.

Im Weiteren sollte untersucht werden, warum die Interleukin-Produktion ausschließlich in Kombination des Cardiolipins mit den Kofaktoren Dotap und Thrombozyten von statten geht. Viktoria Laukemper konnte in ihrer Masterarbeit den kostimulatorischen Effekt der Thrombozyten, nicht jedoch den des Dotap, durch den ERK-Aktivator C6-Ceramid ersetzen und damit zeigen, dass Thrombozyten über die Aktivierung der ERK-Signalkaskade als proinflammatorische Kostimulatoren auf die Monozyten wirken (Laukemper, Masterarbeit). Die Rolle des Dotap blieb weitestgehend ungeklärt und soll nachfolgend näher betrachtet werden.

## **7.2 Einfluss von Dotap auf die IL-6-Induktion durch Cardiolipin in humanen Monozyten**

In der vorliegenden Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf die Funktion des Dotap gelegt. Da Dotap vor allem zur Transfektion genutzt wird, lag die Annahme nahe, dass es auch hier für die Aufnahme des Cardiolipins in die Zellen nötig ist.

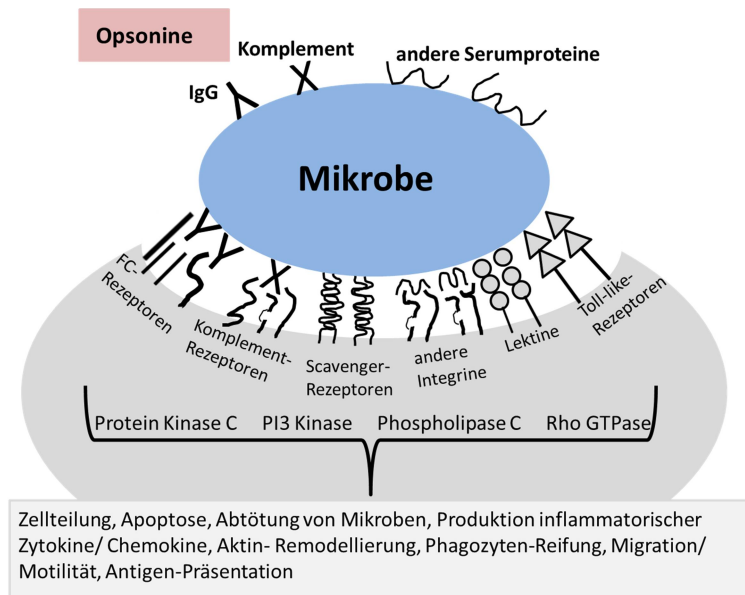
### **7.2.1 Komplexierung des Cardiolipins**

Dotap ist eine kationische Liposomen-bildende Substanz, die zur Transfektion von negativ geladenen Biomolekülen in Zellen genutzt wird. Dotap bildet Mizellen und fusioniert mit Zellmembranen. Dadurch werden die Liposomen im Sinne der Endozytose aufgenommen. Nach der Internalisierung liegt das Mizellen-Vesikel im Endosom vor (Caracciolo et al. 2009). Basierend darauf wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Fähigkeit zur Komplexbildung durch Dotap für die Aufnahme von Cardiolipin in die Zelle nötig ist, um eine IL-6-Sekretion zu induzieren.

Es wurde daher untersucht, ob eine Komplexierung des Cardiolipins durch andere Stoffe die Aufnahme der Partikel ebenfalls ermöglicht und zu einer Zytokinausschüttung führt.

Dotap wurde dazu durch verschiedene Komplex-bildende Substanzen ersetzt. Zum einen wurden Komplexe aus biotinyliertem Cardiolipin und Streptavidin gebildet. Streptavidin bindet mit hoher Affinität an Biotin, wodurch die Formierung der Komplexe zustande kommt (siehe Abbildung 8). Außerdem wurden Komplexe aus biotinyliertem Cardiolipin, Streptavidin und biotinylierten kurzsträngigen DNA-Oligomeren gebildet (siehe Abbildung 8). Es wurde dsDNA verwendet, von der in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass sie von den Monozyten spezifisch aufgenommen werden (siehe Abbildung 9), ohne selbst stimulatorisch zu wirken (siehe Abbildung 10). Die Monozyten reagierten jedoch nach keiner der Komplex-Stimulationen mit einer Interleukin-Sekretion (siehe Abbildung 11). Mit diesem Versuch konnte nicht gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur Komplexbildung des Dotaps, die Aufnahme des Cardiolipins in die Zelle vermittelt. Monozyten und Makrophagen exprimieren verschiedenste Rezeptoren, welche die Phagozytose von Partikeln vermitteln, zum Beispiel Fc-Rezeptoren,

Komplement-Rezeptoren, Scavenger-Rezeptoren, Lektine und Toll-like-Rezeptoren. Die verschiedenen Rezeptoren induzieren unterschiedliche Signalwege. Abbildung 20 gibt eine Übersicht über verschiedene Signalwege, die bei der Erkennung und Phagozytose von Partikeln beteiligt sind.



**Abbildung 20:** Rezeptor- und Signalweg Interaktion während der Phagozytose. Verschiedene Rezeptoren erkennen simultan Partikel, entweder durch direkte Bindung oder durch Bindung von Opsoninen. Die Rezeptorbindung induziert viele intrazelluläre Signalewege.. Modifiziert aus (Underhill und Ozinsky 2002).

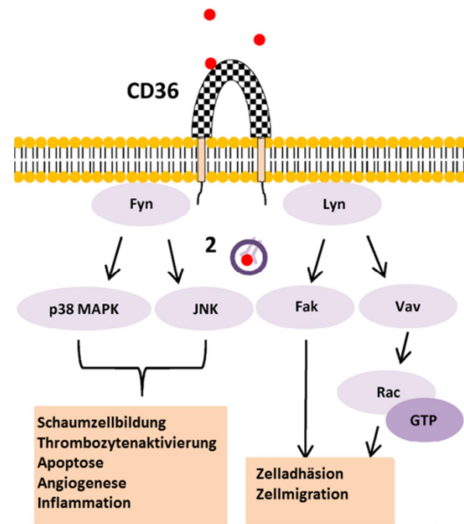
Erschwerend für das Verständnis der Signalgebung nach Phagozytose ist, dass die

meisten Partikel über mehr als einen Rezeptor erkannt werden und diese Rezeptoren zur Interaktion und Synergismus fähig sind (Underhill und Ozinsky 2002).

Für oxidiertes Cardiolipin wurde die Aufnahme über Scavenger-Rezeptoren beschrieben (Wang 2001). Diese Gruppe von Rezeptoren kommt hauptsächlich auf Monozyten und Makrophagen vor und bindet typischerweise Lipoproteine.

Scavenger-Rezeptoren werden in Klasse A bis J unterteilt. Oxidierte Phospholipide, wie oxidiertes LDL (oxLDL), werden vom Klasse B Scavenger Rezeptor SR-B2 (=CD36) erkannt (siehe Abbildung 21). Die Bindung von oxLDL oder Bakterien über CD36 hat eine Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren zur Folge (Erdman et al. 2009).

Die induzierte SR-B2 Signaltransduktion schließt die Tyrosinkinase Fyn, p38 MAPK und c-jun-N-terminalen Kinasen (JNK) ein. Die SR-B2-Aktivierung resultiert des Weiteren in einer Aktivierung der fokalen-Adhäsions-Kinase (FAK)



**Abbildung 21:** Schematische Darstellung der CD36 vermittelten Signaltransduktion nach Bindung oxidierter Phospholipide, modifiziert aus (Zani et al. 2015)

zur Folge und ändert Zell-Adhäsion und Migration. Insbesondere die SR-B2-vermittelte intrazelluläre Signalgebung durch Lyn hat die Phosphorylierung und Aktivierung von Vav-Proteinen zur Folge. Diese agieren als Guanin-Nukleotid-Austausch Faktoren für Rho und Rac GTPasen welche in Aktin-Remodeling, Membrandynamik und Zellmigration beteiligt sind (Zani et al. 2015)

Im Gegensatz zur Beteiligung von CD36 an inflammatorischen Antworten auf verschiedene Moleküle, hat die Internalisierung von apoptotischen Zellen über CD36 keine proinflammatorische Signalgebung zur Folge. Um an der Zytokin-Produktion beteiligt zu sein, ist die Kooperation von CD36 mit anderen Rezeptoren, wie TLR nötig (Erdman et al. 2009).

Dass oxidiertes Cardiolipin über den Scavenger-Rezeptor CD36 aufgenommen wird, gibt einen Hinweis darauf, dass natives Cardiolipin ebenfalls über diese Rezeptorgruppe internalisiert wird. Demgegenüber ist anzunehmen, dass die Oxidierung des Phospholipids für die Rezeptorbindung notwendig ist, vergleichbar mit LDL, welches in oxidierter Form von Scavenger-Rezeptoren gebunden wird. Die Oxidation von LDL-Partikeln erfolgt nach Endozytose durch Endothelzellen spontan in der Intima von Blutgefäßen (Rafieian-Kopaei et al. 2014). Tatsächlich konnten Balasubramanian et al. zeigen, dass Cardiolipin auch im nicht-oxidierten Zustand vom CD36-Rezeptor erkannt wird (Balasubramanian et al. 2015).

Es ist daher möglich, dass die durch Komplexbildung des Cardiolipins mit Streptavidin die Stelle des entsprechenden Rezeptors blockiert wird, sodass Cardiolipin nicht mehr in der Lage ist, an seinen Rezeptor zu binden und eine Zytokin-Produktion auszulösen. Obwohl Dotap in diesem Versuch nicht durch komplex bildende Substanzen zu

ersetzen war, konnte dadurch jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Dotap bei der Aufnahme des Cardiolipins in die Monozyten eine Rolle spielt.

### **7.2.2 Zeitintervall zwischen Cardiolipin- und Dotap-Zugabe zu Monozyten**

Um näher zu untersuchen, ob Dotap für die Aufnahme des Cardiolipins in die Monozyten nötig ist oder seinen kostimulatorischen Effekt auf andere Weise ausübt, wurden Cardiolipin und Dotap zeitversetzt zu den Monozyten gegeben (Abbildung 12). Die Monozyten wurden in diesem Versuch variable Zeiträume mit entweder Cardiolipin und Thrombozyten oder Dotap und Thrombozyten vorinkubiert. Anschließend wurde jeweils Dotap oder Cardiolipin hinzugefügt (siehe 6.2.2 & Abbildung 12).

Behandelt man die Monozyten mit Dotap und gibt zeitlich versetzt Cardiolipin hinzu, kann tatsächlich eine Verringerung der Zytokinproduktion beobachtet werden (siehe Abbildung 13). Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass Dotap für die Aufnahme des Cardiolipins in die Zelle nötig ist, unter der Vorstellung, dass Dotap während der Vorinkubation ohne Cardiolipin in die Zelle gelangt und anschließend nicht mehr vorhanden ist, um Cardiolipin in die Zelle zu transportieren. Dieses kann somit seinen immunstimulatorischen Effekt nicht ausüben, da es außerhalb der Zelle verbleibt.

Behandelt man die Monozyten allerdings mit Cardiolipin und gibt Dotap zeitversetzt hinzu, verringert sich die Zytokinproduktion ebenfalls (siehe Abbildung 14). Die Interleukin-Produktion der Monozyten steigt, je näher die Zeitpunkte der Cardiolipin und Dotap- Stimulationen beieinander liegen. Dieses Ergebnis spricht gegen die These, dass Cardiolipin während der Vorinkubation im Medium verbleibt, bis das Dotap hinzugefügt wird und dann zusammen mit dem Dotap aufgenommen wird. Wenn das so wäre, könnte man, trotz steigender Zeitintervalle, eine konstante Zytokinproduktion erwarten. Dieser Versuch spricht daher dafür, dass Cardiolipin eigenständig in die Zelle gelangt und dort möglicherweise, zu dem Zeitpunkt an dem Dotap hinzugefügt wird, bereits abgebaut wurde.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Dotap nicht zur Aufnahme des Cardiolipins in die Zelle nötig ist. Daher wurde die Annahme entwickelt, dass Dotap seinen kostimulatorischen Effekt auf andere Weise ausübt. Es wurde die Theorie entwickelt, dass mehrere Signale nötig sind, um die Zell-Stimulation durch Cardiolipin zu bewirken. Einerseits die Erk-Stimulation durch die Thrombozyten sowie die Aktivierung eines anderen Signalwegs durch Dotap und andererseits der Signalweg, der durch Cardiolipin induziert wird.

### **7.2.3 Dotap- unabhängige Aufnahme von Cardiolipin in die humanen Monozyten**

Um zu verifizieren, dass Dotap tatsächlich nicht für die Aufnahme des Cardiolipins in die Zelle nötig ist, wurden Monozyten mit biotinyliertem Cardiolipin inkubiert und anschließend mit DAPI und Strep-Alexa594 gefärbt (siehe 6.2.3). DAPI markiert DNA, während sich Strep-Alexa594 an das biotinylierte Cardiolipin anlagert. In den Fluoreszenzaufnahmen lokalisiert das Cardiolipin im Zytoplasma (siehe Abbildung 15). Mit diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, dass Cardiolipin auch ohne die Anwesenheit von Dotap in die Zelle gelangt. Betrachtet man die Kinetik der Aufnahme des Cardiolipins, lässt sich beobachten, dass Cardiolipin partikuläre Strukturen bildet (siehe Abbildung 16). Dies geschieht sowohl mit als auch ohne Dotap-Kostimulation.

Da im Rahmen dieser Arbeit keine Zellorganellen dargestellt wurden, lässt sich nicht sagen, in welchem Zellkompartiment Cardiolipin lokalisiert und inwiefern diese Lokalisation abhängig von der Dotap-Zugabe ist. Da die Fluoreszenzbilder der Monozyten, die Cardiolipin aufgenommen haben, und der Monozyten, die Cardiolipin und Dotap aufgenommen haben, ein identisches Cardiolipin-Muster innerhalb der Zelle zeigen, ist davon auszugehen, dass das Dotap keinen Einfluss darauf hat, in welchem Zellkompartiment Cardiolipin lokalisiert.

Balasubramanian et al. zeigten, dass exogen zugeführtes Cardiolipin von humanen Makrophagen ins Lysosom aufgenommen wird (Balasubramanian et al. 2015).

Ikon et al. konnten hingegen zeigen, dass Cardiolipin, welches an Apolipoprotein A-1 gebunden wurde (CL-ND), in HL60 Zellen aufgenommen wird und im Mitochondrium lokalisiert. Cardiolipin gebunden an Apolipoprotein A-1 stellt so genannte Nanodiscs (ND) dar. Solche Nanodiscs bestehen aus einer diskoiden Phospholipid-Doppelschicht, welche von einem stabilisierenden amphipathischen helikalen Proteingerüst umgeben ist und sind von ihrer Morphologie Lipoproteinen hoher Dichte (high density lipoprotein; HDL) ähnlich. Sie sind wasserlöslich und stabil (Borch und Hamann 2009). Die HL60 Zellen wurden zur CL-ND Transfektion 24 Stunden bei 37°C mit den Cardiolipin-Nanodiscs inkubiert.

Die Cardiolipin-Aufnahme in die Zelle durch die Nanodisc-Technik ist um das 30fache höher, als die von nativem Cardiolipin. Cardiolipin, das auf diese Weise in Zellen transfiziert wurde, lokalisiert im Mitochondrium und nimmt dort sogar seine physiologische Funktion wieder auf. Ob die Zellen auf die Transfektion mit einer inflammatorischen Antwort reagieren, wurde in der Arbeit von Ikon et al. nicht untersucht.

Ikon et al. zeigten die Lokalisation des transfizierten Cardiolipins im Mitochondrium mithilfe der konfokalen Mikroskopie. Die HL60 Zellen wurden dazu mit MitoTracker



gefärbt und TopFluorCL für die Transfektion genutzt. Partikuläre Strukturen, wie in Abbildung 16 zu sehen sind, sind in der Aufnahme von Ikon et al. nur spärlich zu erkennen. Das von Ikon et al. transfizierte Cardiolipin bildet innerhalb der Zellen eine flächige homogene Struktur, die in der zusammengeführten Aufnahme über dem Mitochondrium liegt (Ikon et al. 2015).

Eventuell wird natives Cardiolipin ebenfalls in die Zelle aufgenommen und gelangt, vergleichbar mit dem CL-ND aus der Studie von Ikon et al., innerhalb der Zelle in das Mitochondrium, wo es seine physiologische Funktion wieder aufnimmt, ohne eine inflammatorische Antwort der Zellen zu induzieren.

Die Kostimulatoren Dotap und Thrombozyten fungieren in diesem Model als zusätzliche Faktoren, die nötig sind, damit Cardiolipin als Gefahrensignal erkannt wird. Dotap und Thrombozyten ohne Cardiolipin lösen keine Zytokin-Produktion aus, da sie selbst keine Gefahrensignale darstellen. Es wurde gezeigt, dass Dotap den Inhalt der Liposomen vor enzymatischen Degradation schützt (Remaut et al. 2006). Daher ist zu vermuten, dass Dotap Cardiolipin innerhalb der Zelle stabilisiert und vor frühzeitigem Abbau schützt. Eventuell ist der proinflammatorische Effekt des Cardiolipins in Kombination mit Dotap auf diesen Mechanismus zurückzuführen; Indem es durch den stabilisierenden Effekt verhindert, dass Cardiolipin ins Mitochondrium gelangen kann, wo es physiologische Funktionen aufnimmt. Wenn Cardiolipin im Zytoplasma vorliegt, wird es von NOD-ähnlichen-Rezeptoren erkannt. Diese Rezeptoren nutzen ihre Leucinreichen Sequenzen, um Phospholipid-Vesikel im Zytoplasma zu binden (Seong und Matzinger 2004).

Eine Anfärbung verschiedener Zellkompartimente kann klären, in welches Zellkompartiment natives Cardiolipin, beziehungsweise Cardiolipin in Kombination mit Dotap, gelangt, um herauszufinden, ob Dotap einen Einfluss auf die Lokalisation des Cardiolipins innerhalb der Zelle hat.

### **7.3 Thrombozyten lagern sich an Monozyten an**

Im Rahmen der Mikroskopie konnte zum einen beobachtet werden, dass Thrombozyten ebenfalls Cardiolipin aufnehmen und zum anderen, dass sich die Thrombozyten an die Monozyten anlagern (siehe Abbildung 17). Die Anlagerung muss stabil sein, da während der Aufbereitung der Monozyten zur Fluoreszenzfärbung erhebliche Scherkräfte auf die Monozyten-Thrombozyten Komplexe wirken (5.3).

Thrombozyten sind wichtige Mediatoren der Inflammation. Die Thrombozyten-Aktivierung resultiert unter anderem in einer Erhöhung zirkulierender Thrombozyten-Monozyten-Komplexe (platelet- monocyte complexes; PMC) (van Gils et al. 2009).

Diese PMCs gelten als kardiovaskulärer Risikofaktor (Lippi et al. 2007). Die Anlagerung von Thrombozyten an Monozyten führt zu einer Aktivierung der Monozyten, was in einer Expression von Adhäsions-Molekülen sowie in der Sekretion von Chemokinen resultiert. Dabei spielt die Bindung von P-Selektin an den P-Selektin-Glycoprotein (GP) Ligand 1 (PSGL-1) eine entscheidende Rolle. Die Ligation von P-Selektin und PSGL-1 führt zu einer Tyrosin-Phosphorylierung, unter anderem von ERK (van Gils et al. 2009).

Die Beobachtung, dass sich Thrombozyten an die Monozyten anlagern, bestätigt somit Viktoria Laukempers Ergebnisse, dass Thrombozyten durch direkte Interaktion mit den Monozyten, über Oberflächenmoleküle, zu deren Aktivierung beitragen.

Dass dies über eine Aktivierung der ERK-Signalkaskade geschieht, konnte bereits im Rahmen von Viktoria Laukempers Masterarbeit gezeigt werden.

Des Weiteren deutet die Tatsache, dass Thrombozyten ebenfalls Cardiolipin aufnehmen darauf hin, dass natives Cardiolipin passiv in Zellen gelangt, da für Thrombozyten in der Literatur nicht die Fähigkeit zur Phagozytose, beziehungsweise Endozytose beschrieben ist. Lediglich die Aufnahme von Partikeln über das offene kanalikuläre System (open canalicular system; OCS) der Thrombozyten wird vermutet (Zucker-Franklin 1981). Die hydrophobe Struktur des Cardiolipins macht eine passive Aufnahme der Vesikel über die Zellmembran wahrscheinlich. Balasubramanian et al. zeigen jedoch, dass die Aufnahme von Cardiolipin-Vesikeln CD36 vermittelt und Phagozytose-abhängig ist. Nach Behandlung von humanen Makrophagen mit Cytochalasin D (CytD), einem Inhibitor der Aktin-Polymerisation, ist die Cardiolipin-Aufnahme um 50% reduziert (Balasubramanian et al. 2015). Die Anreicherung der Thrombozyten mit Cardiolipin widerspricht jedoch der Annahme, dass Cardiolipin nur über Phagozytose aufgenommen wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit und die von Balasubramanian et al. lassen sich unter der Vorstellung, dass Phagozytose und passive Aufnahme des Cardiolipins nebeneinander ablaufen, in Einklang bringen. Dieses Modell erklärt auch, warum nach CytD Behandlung humaner Makrophagen die Cardiolipin-Aufnahme nur um 50% reduziert ist.

In der Arbeit von Balasubramanian et al. fehlen Kontrollen, dass die Phagozytose durch CytD zu 100% geblockt ist. Dies hätte zum Beispiel durch Latexbeats erfolgen können.

## **7.4 ERK-Aktivierung nach Stimulation der humanen Monozyten**

Da in den Fluoreszenz-Versuchen nachgewiesen werden konnte, dass die Cardiolipin-Aufnahme in die Zellen unabhängig von Dotap ist, wurde die Theorie entwickelt, dass Dotap den kostimulatorischen Effekt über die Induktion einer Signalkaskade ausübt.

Yan et al. konnten zeigen, dass Dotap in Immunzellen die ERK-Phosphorylierung induziert. Auch Lonez et al. berichten, dass kationische Lipide, wie Dotap, verschiedene MAP-Kinasen, wie p38, JNK oder ERK induzieren (Lonez et al. 2012).

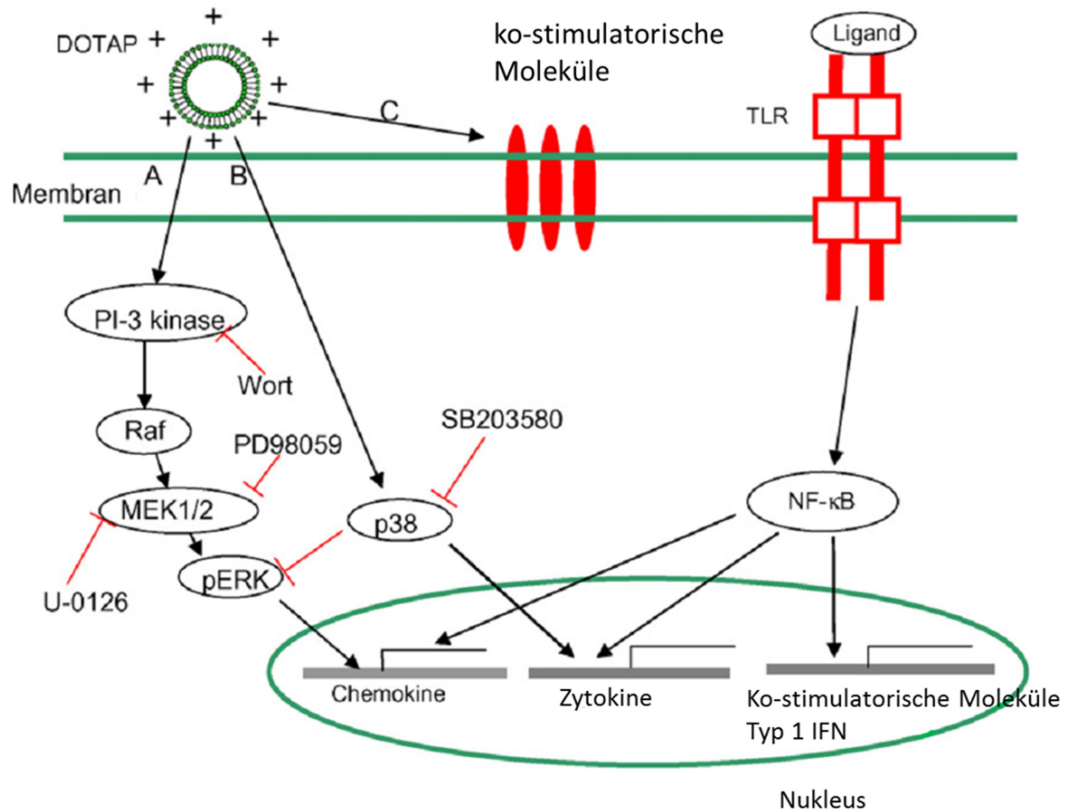
Die Ergebnisse zeigen, dass Dotap, wie die Thrombozyten, durch eine Induktion des ERK-Signalweges zu einer IL-6-Produktion führt (Yan et al. 2007). Auch für Cardiolipin ist beschrieben, dass es eine ERK-Phosphorylierung auslöst (Arivazhagan und Ayusawa 2007). Mittels eines Western-Blots wurde die Menge phosphorylierten ERKs nach verschiedenen Stimulationen bestimmt (6.4). Erwartet wurde eine besonders hohe Menge an aktivierten ERK nach der Stimulation mit Cardiolipin gemeinsam mit beiden Kofaktoren. Jedoch waren, entgegen dieser Erwartung, die Banden bei dieser Stimulation viel schwächer, als bei den anderen Stimulationen (siehe Abbildung 18).

Cardiolipin, Thrombozyten und Dotap induzieren für sich genommen den ERK-Signalweg, inhibieren ihn jedoch in Kombination. Trotzdem kommt es ausschließlich in dieser Kombination zu einer IL-6-Ausschüttung.

Die These, dass eine bestimmte Menge an phosphorylierten ERK in der Zelle akkumulieren muss, um eine Zytokinproduktion zu bewirken, wurde somit widerlegt.

Für Dotap ist in der Literatur nicht ausschließlich eine ERK-aktivierende Eigenschaft beschrieben. Dotap ist auch in der Lage die ERK-Aktivierung herunterzuregulieren.

Yan et al. konnten zeigen, dass Dotap in dendritischen Zellen einerseits die ERK-Aktivierung, über die PI-3-Kinase triggert. Andererseits hemmt Dotap die ERK-Aktivierung über eine Aktivierung von p38, was die ERK-Aktivierung herunterreguliert (siehe Abbildung 22) (Yan et al. 2007).



**Abbildung 22** : Signalwegmodell, welches zur Aktivierung dendritischer Zellen und Expression von Chemokinen und Zytokinen durch die Induktion von Dotap-Liposomen führt. **(A)** Dotap triggert die ERK-Aktivierung durch die PI-3 Kinase. **(B)** Dotap aktiviert auch p38, welches die ERK-Aktivierung negativ reguliert. **(C)** Durch einen unbekannten Mechanismus induziert Dotap die Expression kostimulatorischer Moleküle und dendritische-Zell-Aktivierung. Modifiziert aus: Yan, Weili; Chen, Weihsu; Huang, Leaf (2007): Mechanism of adjuvant activity of cationic liposome: phosphorylation of a MAP kinase, ERK and induction of chemokines. In: *Mol. Immunol.* 44 (15), S. 3672–3681. DOI: 10.1016/j.molimm.2007.04.009

Die von Yan et al. aufgestellte These lässt sich mit den Ergebnissen der Western Blot-Analysen dieser Arbeit vereinbaren. Es konnte gezeigt werden, dass Dotap den ERK-Signalweg induziert (siehe Abbildung 18). Abhängig von anderen Stimuli überwiegt jedoch der ERK-Inhibierende Effekt; Eventuell indem durch Interaktion der Stimuli auch andere, ERK-inhibierende Signalwege, aktiviert werden (siehe Abbildung 22 **B**). Dieses Modell kann Viktoria Laukempers Ergebnisse erklären, die den kostimulatorischen Effekt der Thrombozyten, nicht jedoch den des Dotap, durch den ERK-Aktivator C6-Ceramid ersetzen konnte.

Auf der Abbildung 22 ist zu sehen, dass eine Aktivierung der p38-Kinase zu einer Zytokin-Produktion führen kann, ähnlich wie der NF-κB-Weg. Untersuchungen darüber inwiefern sich die MAP-Kinase Wege gegenseitig beeinflussen, könnten die intrazellulären Vorgänge klären, die hinter der Zytokinproduktion nach Cardiolipin-Stimulation stehen.

## 7.5 Beteiligung des Inflammasoms an der Zytokinproduktion

Lyer et al. konnten zeigen, dass nach Stimulierung LPS-vorbehandelter Makrophagen mit Linezolid mitochondriales Cardiolipin durch direkte Bindung das Nlrp-3 Inflammasom aktiviert, und so zu einer IL-1 $\beta$ -Sekretion führt. Linezolid beschädigt das Mitochondrium und bewirkt dadurch eine Cardiolipinfreisetzung ins Zytoplasma.

Die Autoren postulieren, dass Cardiolipin bei der Nlrp-3 Aktivierung einerseits als mitochondriale Andockstelle für den Inflammasom-Aufbau dient und zudem einen direkten Aktivierungsliganden für Nlrp-3 darstellt. Auch hier wurde die These aufgestellt, dass Cardiolipin aufgrund seiner phylogenetischen Herkunft aus Bakterien als endogenes PAMP fungiert (Lyer et al. 2013). Nlrp-3 erkennt mikrobielle Produkte und Substanzen die Zellschäden und -tod indizieren. Dazu gehört auch Cardiolipin (Seong und Matzinger 2004).

Werden Mitochondrien dysfunktional tritt Cardiolipin, das physiologisch nur in der inneren Mitochondrienmembran vorkommt, an die äußere Mitochondrienmembran und wird über die Leucin-reiche-Sequenz (leucine rich repeat; LRR) des Nlrp-3 Inflammasoms als Gefahrensignal erkannt (O'Neill 2013).

Basierend auf dieser Arbeit wurde die Annahme entwickelt, dass ebenso extern zugeführtes Cardiolipin zu einer Inflammasom-Aktivierung mit anschließender IL-1 $\beta$ -Sekretion führen könnte. Daher wurde im Überstand der Stimulationsversuche anstatt IL-6 IL-1 $\beta$  gemessen (siehe 6.5). Auf ein LPS-Priming der Monozyten wurde dabei verzichtet, da die Caspase 1 in humanen Monozyten konstitutiv exprimiert wird (Martinon et al. 2002).

Cardiolipin war jedoch auch hier nur in Kombination mit Dotap und Thrombozyten in der Lage eine IL-1 $\beta$ -Ausschüttung zu stimulieren. Stimulierte man die humanen Monozyten mit Cardiolipin ohne diese Kofaktoren war kein IL-1 $\beta$  im Überstand nachweisbar (siehe Abbildung 19).

Lyer et al. postulieren, dass Cardiolipin als Andockstelle für das Inflammasom am Mitochondrium dient. Des Weiteren wurde erwähnt, dass das Zusammenspiel von Cardiolipin und mitochondrialer DNA essentiell für den Aufbau des Inflammasom ist. Exogen zugeführtes Cardiolipin kann demnach diese Funktion dann nicht erfüllen, da es nicht an das Mitochondrium gebunden ist und nicht in Kontakt mit mitochondrialer DNA tritt. Trotzdem ist davon auszugehen, dass exogen zugeführtes Cardiolipin im Zytoplasma vom Inflammasom erkannt wird.

Die in Abschnitt 7.2.3 verfasste Theorie, dass natives Cardiolipin ohne Kofaktoren nicht als Gefahrensignal erkannt wird, würde jedoch erklären, weshalb das in dieser Arbeit exogen zugeführte Cardiolipin ebenfalls nicht zu einer IL-1 $\beta$  führt. Im Gegensatz zu der Vorgehensweise der vorliegenden Arbeit haben Lyer et al. Linezolid verwendet, um

das Mitochondrium zu schädigen und die resultierende Cardiolipinfreisetzung zu bewirken. Des Weiteren wurden die von Lyer et al. verwendeten Zellen mit LPS vorbehandelt. Diese Behandlung der Zellen könnte an sich kostimulatorisch gewirkt haben. Es ist davon auszugehen, dass im Rahmen einer Schädigung des Mitochondriums eine Cardiolipinfreisetzung nicht der einzige Effekt ist. Andere mitochondriale Bestandteile, beispielsweise mitochondriale DNA, könnten gleichzeitig freigesetzt worden sein und proinflammatorisch gewirkt haben. Zudem ist bekannt, dass kommerziell erhältliches LPS mit Peptidoglykan verunreinigt ist, welches ein Inflammasom-aktivator ist (Martinon et al. 2004).

Die IL-1 Produktion, die sowohl von Lyer et al. als auch in dieser Arbeit, nach Stimulation der Zellen mit Cardiolipin in Kombination mit den Kofaktoren beobachtet werden konnte, könnte im Sinne einer positiven Rückkopplung zur IL-6-Produktion beitragen.

Von IL-1 ist bekannt, dass es ein starker Aktivator der IL-6-Synthese ist (Striz et al. 2014). Eine These ist, dass Cardiolipin vom Nlrp3-Inflammasom erkannt wird und durch die Kostimulation mit Dotap und Thrombozyten eine IL-1 Produktion bewirkt. IL-1 bewirkt im Sinne einer positiven Rückkopplung eine IL-6 Produktion.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Cardiolipin immunstimulatorische Fähigkeiten hat. Verwendet man die Kostimulatoren Thrombozyten und Dotap, stimuliert es eine Zytokinproduktion in humanen Monozyten. Es konnte im konfokalen Mikroskop gezeigt werden, dass Cardiolipin eigenständig in die Zelle gelangt. Dies geschieht passiv durch seine hydrophoben Eigenschaften, da es auch in Thrombozyten nachweisbar ist. Vermutlich wird es parallel per Phagozytose über den CD36-Rezeptor aufgenommen. Weitere Versuche sollten klären, in welchem Zellkompartiment Cardiolipin nach Aufnahme lokalisiert.

Balasubramanian et al. postulieren, dass Cardiolipin auf apoptotischen Zellen als „friss mich“-Signal gezeigt wird. Wird es phagozytiert, hemmt es die Inflammation. Dies könnte die Funktion haben, die Hämostase zu wahren (Balasubramanian et al. 2015). Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass die Internalisierung von apoptotischen Zellen über CD36 keine proinflammatorische Signalgebung zur Folge hat (Erdman et al. 2009). Dies erklärt, wieso Cardiolipin in dieser Arbeit Kofaktoren bedarf um als PAMP erkannt zu werden und infolgedessen eine Inflammation zu initiieren.

Von Thrombozyten ist bereits bekannt, dass sie durch Anlagerung an Monozyten zu einer Aktivierung der Monozyten führen (van Gils et al. 2009) und durch ERK-Stimulation einen kostimulatorischen Effekt ausüben (Laukemper, Masterarbeit). Die Rolle des Dotap konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Es

ist möglich, dass es das Cardiolipin innerhalb des Zytosols stabilisiert, sodass es dort vom Nlrp3-Inflammasom erkannt wird und infolge eine IL-1-Produktion initiiert wird. IL-1 führt über eine positive Rückkopplung zur IL-6-Produktion.

Eine andere These ist, dass Dotap einen separaten Signalweg induziert und erst die synergistische Induktion der Dotap- und Thrombozyten-induzierten Signalwege im Zusammenspiel eine Erkennung des Cardiolipins als Gefahrensignal ermöglicht.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abbas, Abul K.; Lichtman, Andrew H.; Pillai, Shiv (2014): Basic immunology. Functions and disorders of the immune system. 4. Aufl. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders. Online verfügbar unter [http://scans.hebis.de/HEBCGI/show.pl?31079696\\_kub.html](http://scans.hebis.de/HEBCGI/show.pl?31079696_kub.html).
- Alberts, Bruce (2011): Molekularbiologie der Zelle. 5. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- Arivazhagan, Palaniyappan; Ayusawa, Dai (2007): Cardiolipin activates MAP kinases during premature senescence in normal human fibroblasts. In: *Biogerontology* 8 (6), S. 621–626. DOI: 10.1007/s10522-007-9103-9.
- Auffray, C.; Fogg, D.; Garfa, M.; Elain, G.; Join-Lambert, O.; Kayal, S. et al. (2007): Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. In: *Science* 317 (5838), S. 666–670. DOI: 10.1126/science.1142883.
- Auffray, Cedric; Sieweke, Michael H.; Geissmann, Frederic (2009): Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. In: *Annu. Rev. Immunol.* 27 (1), S. 669–692. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557.
- Balasubramanian, Krishnakumar; Maeda, Akihiro; Lee, Janet S.; Mohammadyani, Dariush; Dar, Haider Hussain; Jiang, Jian Fei et al. (2015): Dichotomous roles for externalized cardiolipin in extracellular signaling: Promotion of phagocytosis and attenuation of innate immunity. In: *Science signaling* 8 (395), S. ra95. DOI: 10.1126/scisignal.aaa6179.
- Belge, Kai-Uwe; Dayyani, Farshid; Horelt, Alexia; Siedlar, Maciej; Frankenberger, Marion; Frankenberger, Bernhard et al. (2002): The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. In: *J. Immunol.* 168 (7), S. 3536–3542.
- Berliner, J.; Leitinger, N.; Watson, A.; Huber, J.; Fogelman, A.; Navab, M. (1997): Oxidized lipids in atherogenesis: formation, destruction and action. In: *Thromb. Haemost.* 78 (1), S. 195–199.
- Betelli, Estelle; Carrier, Yijun; Gao, Wenda; Korn, Thomas; Strom, Terry B.; Oukka, Mohamed et al. (2006): Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. In: *Nature* 441 (7090), S. 235–238. DOI: 10.1038/nature04753.
- Borch, Jonas; Hamann, Thomas (2009): The nanodisc: a novel tool for membrane protein studies. In: *Biol. Chem.* 390 (8), S. 805–814. DOI: 10.1515/BC.2009.091.
- Braunersreuther, V.; Steffens, S.; Arnaud, C.; Pelli, G.; Burger, F.; Proudfoot, A.; Mach, F. (2008): A Novel RANTES Antagonist Prevents Progression of Established Atherosclerotic Lesions in Mice. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (6), S. 1090–1096. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.165423.
- Braunersreuther, V.; Zernecke, A.; Arnaud, C.; Liehn, E. A.; Steffens, S.; Shagdarsuren, E. et al. (2006): Ccr5 But Not Ccr1 Deficiency Reduces Development of Diet-Induced Atherosclerosis in Mice. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (2), S. 373–379. DOI: 10.1161/01.ATV.0000253886.44609.ae.
- Caracciolo, Giulio; Caminiti, Ruggero; Digman, Michelle A.; Gratton, Enrico; Sanchez, Susana (2009): Efficient escape from endosomes determines the superior efficiency of multicomponent lipoplexes. In: *The journal of physical chemistry. B* 113 (15), S. 4995–4997. DOI: 10.1021/jp811423r.



- Castro, A. R.; Morrill, W. E.; Shaw, W. A.; Gale, D. C.; Park, M. M.; Peregrino-Ferreira, L. A. et al. (2000): Use of synthetic cardiolipin and lecithin in the antigen used by the venereal disease research laboratory test for serodiagnosis of syphilis. In: *Clin Diagn Lab Immunol* 7 (4), S. 658–661.
- CHAIET, L.; WOLF, F. J. (1964): THE PROPERTIES OF STREPTAVIDIN, A BIOTIN-BINDING PROTEIN PRODUCED BY STREPTOMYCETES. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 106, S. 1–5.
- Dalebroux, Zachary D.; Matamouros, Susana; Whittington, Dale; Bishop, Russell E.; Miller, Samuel I. (2014): PhoPQ regulates acidic glycerophospholipid content of the *Salmonella Typhimurium* outer membrane. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (5), S. 1963–1968. DOI: 10.1073/pnas.1316901111.
- Danese, Silvio; Dejana, Elisabetta; Fiocchi, Claudio (2007): Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. In: *J. Immunol.* 178 (10), S. 6017–6022.
- Deguchi, H.; Fernandez, J. A.; Hackeng, T. M.; Banka, C. L.; Griffin, J. H. (2000): Cardiolipin is a normal component of human plasma lipoproteins. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (4), S. 1743–1748.
- Du, Vivian X.; Kelchtermans, Hilde; Groot, Philip G. de; Laat, Bas de (2013): From antibody to clinical phenotype, the black box of the antiphospholipid syndrome: Pathogenic mechanisms of the antiphospholipid syndrome. In: *Thrombosis Research* 132 (3), S. 319–326. DOI: 10.1016/j.thromres.2013.07.023.
- Erdman, Laura K.; Cosio, Gabriela; Helmers, Andrew J.; Gowda, D. Channe; Grinstein, Sergio; Kain, Kevin C. (2009): CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (10), S. 6452–6459. DOI: 10.4049/jimmunol.0901374.
- Fingerle-Rowson, G.; Auers, J.; Kreuzer, E.; Fraunberger, P.; Blumenstein, M.; Ziegler-Heitbrock, L. H. (1998): Expansion of CD14+CD16+ monocytes in critically ill cardiac surgery patients. In: *Inflammation* 22 (4), S. 367–379.
- Freedman, J. E. (2005): Molecular Regulation of Platelet-Dependent Thrombosis. In: *Circulation* 112 (17), S. 2725–2734. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.494468.
- Frostedgård, Johan (2005): Atherosclerosis in patients with autoimmune disorders. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (9), S. 1776–1785. DOI: 10.1161/01.ATV.0000174800.78362.ec.
- Furie, Bruce; Furie, Barbara C. (2008): Mechanisms of Thrombus Formation. In: *N Engl J Med* 359 (9), S. 938–949. DOI: 10.1056/NEJMr0801082.
- Garraud, Olivier; Cognasse, Fabrice (2010): Platelet Toll-like receptor expression: the link between "danger" ligands and inflammation. In: *Inflamm Allergy Drug Targets* 9 (5), S. 322–333.
- Garrido, C.; Galluzzi, L.; Brunet, M.; Puig, P. E.; Didelot, C.; Kroemer, G. (2006): Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. In: *Cell Death Differ.* 13 (9), S. 1423–1433. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401950.
- Geissmann, Frederic; Jung, Steffen; Littman, Dan R. (2003): Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. In: *Immunity* 19 (1), S. 71–82. DOI: 10.1016/S1074-7613(03)00174-2.

- Giannakopoulos, Bill; Passam, Freda; Ioannou, Yiannis; Krilis, Steven A. (2009): How we diagnose the antiphospholipid syndrome. In: *Blood* 113 (5), S. 985–994. DOI: 10.1182/blood-2007-12-129627.
- Gomez, Baltazar; Robinson, Neal C. (1999): Phospholipase Digestion of Bound Cardiolipin Reversibly Inactivates Bovine Cytochrome bc1 $\dagger$ . In: *Biochemistry* 38 (28), S. 9031–9038. DOI: 10.1021/bi990603r.
- Gonzalvez, F.; Schug, Z. T.; Houtkooper, R. H.; MacKenzie, E. D.; Brooks, D. G.; Wanders, R. J.A et al. (2008): Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. In: *The Journal of Cell Biology* 183 (4), S. 681–696. DOI: 10.1083/jcb.200803129.
- Gonzalvez, François; Gottlieb, Eyal (2007): Cardiolipin: setting the beat of apoptosis. In: *Apoptosis* 12 (5), S. 877–885. DOI: 10.1007/s10495-007-0718-8.
- Gordon, Siamon; Taylor, Philip R. (2005): Monocyte and macrophage heterogeneity. In: *Nat Rev Immunol* 5 (12), S. 953–964. DOI: 10.1038/nri1733.
- Grage-Griebenow, E.; Flad, H. D.; Ernst, M. (2001): Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. In: *J Leukoc Biol* 69 (1), S. 11–20.
- Greig, Fiona H.; Kennedy, Simon; Spickett, Corinne M. (2012): Physiological effects of oxidized phospholipids and their cellular signaling mechanisms in inflammation. In: *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2), S. 266–280. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.481.
- Haines, Thomas H.; Dencher, Norbert A. (2002): Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. In: *FEBS Lett.* 528 (1-3), S. 35–39.
- Hansson, Göran K. (2005): Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. In: *N. Engl. J. Med.* 352 (16), S. 1685–1695. DOI: 10.1056/NEJMra043430.
- Hansson, Göran K.; Hermansson, Andreas (2011): The immune system in atherosclerosis. In: *Nat Immunol* 12 (3), S. 204–212. DOI: 10.1038/ni.2001.
- Helgadottir, Anna; Manolescu, Andrei; Thorleifsson, Gudmar; Gretarsdottir, Solveig; Jonsdottir, Helga; Thorsteinsdottir, Unnur et al. (2004): The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. In: *Nat. Genet.* 36 (3), S. 233–239. DOI: 10.1038/ng1311.
- Houtkooper, R. H.; Vaz, F. M. (2008): Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (16), S. 2493–2506. DOI: 10.1007/s00018-008-8030-5.
- Ikon, Nikita; Su, Betty; Hsu, Fong-Fu; Forte, Trudy M.; Ryan, Robert O. (2015): Exogenous cardiolipin localizes to mitochondria and prevents TAZ knockdown-induced apoptosis in myeloid progenitor cells. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464 (2), S. 580–585. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.012.
- Iwasaki, A.; Medzhitov, R. (2010): Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. In: *Science* 327 (5963), S. 291–295. DOI: 10.1126/science.1183021.
- Iyer, Shankar S.; He, Qiong; Janczy, John R.; Elliott, Eric I.; Zhong, Zhenyu; Olivier, Alicia K. et al. (2013): Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. In: *Immunity* 39 (2), S. 311–323. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.08.001.
- Janeway, Charles A., JR; Medzhitov, Ruslan (2002): Innate immune recognition. In: *Annu Rev Immunol* 20, S. 197–216. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.

- Kasirer-Friede, Ana; Kahn, Mark L.; Shattil, Sanford J. (2007): Platelet integrins and immunoreceptors. In: *Immunol. Rev.* 218, S. 247–264. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00532.x.
- Kawai, Taro; Akira, Shizuo (2011): Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. In: *Immunity* 34 (5), S. 637–650. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.05.006.
- Krysko, Dmitri V.; Agostinis, Patrizia; Krysko, Olga; Garg, Abhishek D.; Bachert, Claus; Lambrecht, Bart N.; Vandenabeele, Peter (2011): Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. In: *Trends Immunol* 32 (4), S. 157–164. DOI: 10.1016/j.it.2011.01.005.
- LECOCQ, J.; BALLOU, C. E. (1964): ON THE STRUCTURE OF CARDIOLIPIN. In: *Biochemistry* 3, S. 976–980.
- Li, Xiao-Xiao; Tsoi, Bun; Li, Yi-Fang; Kurihara, Hiroshi; He, Rong-Rong (2015): Cardiolipin and its different properties in mitophagy and apoptosis. In: *J. Histochem. Cytochem.* 63 (5), S. 301–311. DOI: 10.1369/0022155415574818.
- Libby, P.; Nahrendorf, M.; Pittet, M. J.; Swirski, F. K. (2008): Diversity of Denizens of the Atherosclerotic Plaque: Not All Monocytes Are Created Equal. In: *Circulation* 117 (25), S. 3168–3170. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.783068.
- Lippi, Giuseppe; Montagnana, Martina; Salvagno, Gian Luca; Cicorella, Nicola; Degan, Maurizio; Minuz, Piero et al. (2007): Risk stratification of patients with acute myocardial infarction by quantification of circulating monocyte-platelet aggregates. In: *Int. J. Cardiol.* 115 (1), S. 101–102. DOI: 10.1016/j.ijcard.2005.12.017.
- Lonez, Caroline; Vandenbranden, Michel; Ruyschaert, Jean-Marie (2012): Cationic lipids activate intracellular signaling pathways. In: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (15), S. 1749–1758. DOI: 10.1016/j.addr.2012.05.009.
- Luttmann, Werner; Bratke, Kai; Küpper, Michael; Myrtek, Daniel (2009): Der Experimentator: Immunologie. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag (Der Experimentator).
- Martinon, Fabio; Agostini, Laetitia; Meylan, Etienne; Tschopp, Jürg (2004): Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. In: *Current biology : CB* 14 (21), S. 1929–1934. DOI: 10.1016/j.cub.2004.10.027.
- Martinon, Fabio; Burns, Kimberly; Tschopp, Jürg (2002): The Inflammasome. In: *Molecular Cell* 10 (2), S. 417–426. DOI: 10.1016/S1097-2765(02)00599-3.
- Mizuno, K.; Toma, T.; Tsukiji, H.; Okamoto, H.; Yamazaki, H.; Ohta, K. et al. (2005): Selective expansion of CD16<sup>high</sup>CCR2<sup>-</sup> subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. In: *Clin Exp Immunol* 0 (0), S. 050911055050003. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2005.02932.x.
- Moore, Kathryn J.; Tabas, Ira (2011): Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. In: *Cell* 145 (3), S. 341–355. DOI: 10.1016/j.cell.2011.04.005.
- Moresco, Eva Marie Y.; LaVine, Diantha; Beutler, Bruce (2011): Toll-like receptors. In: *Current Biology* 21 (13), S. R488-R493. DOI: 10.1016/j.cub.2011.05.039.
- Murphy, Kenneth (2012): Janeway's immunobiology. 8. Aufl. New York: Garland Science. Online verfügbar unter QR181.J37 2012.

- Nishimoto, Satoko; Nishida, Eisuke (2006): MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. In: *EMBO Rep* 7 (8), S. 782–786. DOI: 10.1038/sj.embor.7400755.
- Nowicki, Marcin; Müller, Frank; Frentzen, Margrit (2005): Cardiolipin synthase of *Arabidopsis thaliana*. In: *FEBS Letters* 579 (10), S. 2161–2165. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.03.007.
- Ogawa, M. (1993): Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. In: *Blood* 81 (11), S. 2844–2853.
- O'Neill, Luke A. J. (2013): Cardiolipin and the Nlrp3 inflammasome. In: *Cell Metab.* 18 (5), S. 610–612. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.10.013.
- Palinski, W.; Tangirala, R. K.; Miller, E.; Young, S. G.; Witztum, J. L. (1995): Increased autoantibody titers against epitopes of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice with increased atherosclerosis. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 (10), S. 1569–1576.
- Pearson, G.; Robinson, F.; Beers Gibson, T.; Xu, B. E.; Karandikar, M.; Berman, K.; Cobb, M. H. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. In: *Endocr. Rev.* 22 (2), S. 153–183. DOI: 10.1210/edrv.22.2.0428.
- Quehenberger, O. (2005): Thematic Review Series: The Immune System and Atherogenesis. Molecular mechanisms regulating monocyte recruitment in atherosclerosis. In: *The Journal of Lipid Research* 46 (8), S. 1582–1590. DOI: 10.1194/jlr.R500008-JLR200.
- Rafieian-Kopaei, Mahmoud; Setorki, Mahbubeh; Douadi, Monir; Baradaran, Azar; Nasri, Hamid (2014): Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. In: *International journal of preventive medicine* 5 (8), S. 927–946.
- Remaut, K.; Lucas, B.; Braeckmans, K.; Sanders, N. N.; Demeester, J.; Smedt, S. C. de (2006): Delivery of phosphodiester oligonucleotides: can DOTAP/DOPE liposomes do the trick? In: *Biochemistry* 45 (6), S. 1755–1764. DOI: 10.1021/bi0519755.
- Ruggeri, Z. M.; Mendolicchio, G. L. (2007): Adhesion Mechanisms in Platelet Function. In: *Circulation Research* 100 (12), S. 1673–1685. DOI: 10.1161/01.RES.0000267878.97021.ab.
- Schaper, Fred; Rose-John, Stefan (2015): Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. In: *Cytokine Growth Factor Rev.* DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.07.004.
- Schlame, M.; Rua, D.; Greenberg, M. L. (2000): The biosynthesis and functional role of cardiolipin. In: *Prog. Lipid Res.* 39 (3), S. 257–288.
- SCHLAME, Michael; BRODY, Stuart; HOSTETLER, Karl Y. (1993): Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes. Comparison of biosynthetic reactions and molecular acyl species. In: *Eur J Biochem* 212 (3), S. 727–733. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17711.x.
- Semple, John W.; Italiano, Joseph E.; Freedman, John (2011): Platelets and the immune continuum. In: *Nat Rev Immunol* 11 (4), S. 264–274. DOI: 10.1038/nri2956.
- Seong, Seung-Yong; Matzinger, Polly (2004): Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. In: *Nat. Rev. Immunol.* 4 (6), S. 469–478. DOI: 10.1038/nri1372.
- Serbina, Natalya V.; Jia, Ting; Hohl, Tobias M.; Pamer, Eric G. (2008): Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. In: *Annu. Rev. Immunol.* 26 (1), S. 421–452. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326.

- Serbina, Natalya V.; Pamer, Eric G. (2006): Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. In: *Nat. Immunol.* 7 (3), S. 311–317. DOI: 10.1038/ni1309.
- Shi, Z.; Cai, Z.; Sanchez, A.; Zhang, T.; Wen, S.; Wang, J. et al. (2011): A Novel Toll-like Receptor That Recognizes Vesicular Stomatitis Virus. In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (6), S. 4517–4524. DOI: 10.1074/jbc.M110.159590.
- Striz, Ilja; Brabcova, Eva; Kolesar, Libor; Sekerkova, Alena (2014): Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. In: *Clin. Sci.* 126 (9), S. 593–612. DOI: 10.1042/CS20130497.
- Su, Jun; Hua, Xiang; Vikström, Max; Leander, Karin; Gigante, Bruna; Hellenius, Mai-Lis et al. (2013): Low levels of IgM antibodies to oxidized cardiolipin increase and high levels decrease risk of cardiovascular disease among 60-year olds: a prospective study. In: *BMC Cardiovasc Disord* 13, S. 1. DOI: 10.1186/1471-2261-13-1.
- Takeuchi, Osamu; Akira, Shizuo (2010): Pattern Recognition Receptors and Inflammation. In: *Cell* 140 (6), S. 805–820. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- Underhill, David M.; Ozinsky, Adrian (2002): P HAGO CYTOSIS OF M ICROBES. Complexity in Action. In: *Annu. Rev. Immunol.* 20 (1), S. 825–852. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.103001.114744.
- van Gils, J. M.; Zwaginga, J. J.; Hordijk, P. L. (2009): Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. In: *Journal of Leukocyte Biology* 85 (2), S. 195–204. DOI: 10.1189/jlb.0708400.
- Vieira-de-Abreu, Adriana; Campbell, Robert A.; Weyrich, Andrew S.; Zimmerman, Guy A. (2012): Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. In: *Semin Immunopathol* 34 (1), S. 5–30. DOI: 10.1007/s00281-011-0286-4.
- Vollmer, Jörg; Weeratna, Risini; Payette, Paul; Jurk, Marion; Schetter, Christian; Laucht, Meike et al. (2004): Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. In: *Eur. J. Immunol.* 34 (1), S. 251–262. DOI: 10.1002/eji.200324032.
- Wan, Min; Hua, Xiang; Su, Jun; Thiagarajan, Divya; Frostegård, Anna G.; Haeggström, Jesper Z.; Frostegård, Johan (2014): Oxidized but not native cardiolipin has pro-inflammatory effects, which are inhibited by Annexin A5. In: *Atherosclerosis* 235 (2), S. 592–598. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.05.913.
- Wan, Min; Sabirsh, Alan; Wetterholm, Anders; Agerberth, Birgitta; Haeggström, Jesper Z. (2007): Leukotriene B4 triggers release of the cathelicidin LL-37 from human neutrophils: novel lipid-peptide interactions in innate immune responses. In: *FASEB J.* 21 (11), S. 2897–2905. DOI: 10.1096/fj.06-7974com.
- Wang, X. (2001): The expanding role of mitochondria in apoptosis. In: *Genes Dev.* 15 (22), S. 2922–2933.
- Weber, C.; Belge, K. U.; Hundelshausen, P. von; Draude, G.; Steppich, B.; Mack, M. et al. (2000): Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. In: *J. Leukoc. Biol.* 67 (5), S. 699–704.
- Weber, Christian; Noels, Heidi (2011): Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. In: *Nat Med* 17 (11), S. 1410–1422. DOI: 10.1038/nm.2538.
- Weiner, L. M.; Li, W.; Holmes, M.; Catalano, R. B.; Dohnarsky, M.; Padavic, K.; Alpaugh, R. K. (1994): Phase I trial of recombinant macrophage colony-

stimulating factor and recombinant gamma-interferon: toxicity, monocytosis, and clinical effects. In: *Cancer Res* 54 (15), S. 4084–4090.

Weyrich, A. S.; Lindemann, S.; Zimmerman, G. A. (2003): The evolving role of platelets in inflammation. In: *J. Thromb. Haemost.* 1 (9), S. 1897–1905.

Weyrich, Andrew S.; Zimmerman, Guy A. (2004): Platelets: signaling cells in the immune continuum. In: *Trends Immunol.* 25 (9), S. 489–495. DOI: 10.1016/j.it.2004.07.003.

Wicki, A. N.; Walz, A.; Gerber-Huber, S. N.; Wenger, R. H.; Vornhagen, R.; Clemetson, K. J. (1989): Isolation and characterization of human blood platelet mRNA and construction of a cDNA library in lambda gt11. Confirmation of the platelet derivation by identification of GPIb coding mRNA and cloning of a GPIb coding cDNA insert. In: *Thromb. Haemost.* 61 (3), S. 448–453.

Williams, Michael J. (2007): Drosophila hemopoiesis and cellular immunity. In: *J. Immunol.* 178 (8), S. 4711–4716.

Xu, Y.; Condell, M.; Plesken, H.; Edelman-Novemsky, I.; Ma, J.; Ren, M.; Schlame, M. (2006): A Drosophila model of Barth syndrome. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (31), S. 11584–11588. DOI: 10.1073/pnas.0603242103.

Yamasaki, K.; Taga, T.; Hirata, Y.; Yawata, H.; Kawanishi, Y.; Seed, B. et al. (1988): Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. In: *Science* 241 (4867), S. 825–828.

Yan, Weili; Chen, Weihsu; Huang, Leaf (2007): Mechanism of adjuvant activity of cationic liposome: phosphorylation of a MAP kinase, ERK and induction of chemokines. In: *Mol. Immunol.* 44 (15), S. 3672–3681. DOI: 10.1016/j.molimm.2007.04.009.

Yeaman, Michael R. (2010): Platelets in defense against bacterial pathogens. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (4), S. 525–544. DOI: 10.1007/s00018-009-0210-4.

Ylitalo, R.; Oksala, O.; Ylä-Herttuala, S.; Ylitalo, P. (1994): Effects of clodronate (dichloromethylene bisphosphonate) on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. In: *J. Lab. Clin. Med.* 123 (5), S. 769–776.

Yudkin, John S.; Kumari, Meena; Humphries, Steve E.; Mohamed-Ali, Vidya (2000): Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? In: *Atherosclerosis* 148 (2), S. 209–214. DOI: 10.1016/S0021-9150(99)00463-3.

Zani, Izma Abdul; Stephen, Sam L.; Mughal, Nadeem A.; Russell, David; Homer-Vanniasinkam, Shervanthi; Wheatcroft, Stephen B.; Ponnambalam, Sreenivasan (2015): Scavenger receptor structure and function in health and disease. In: *Cells* 4 (2), S. 178–201. DOI: 10.3390/cells4020178.

Ziegler-Heitbrock, H. W.; Ströbel, M.; Kieper, D.; Fingerle, G.; Schlunck, T.; Petersmann, I. et al. (1992): Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. In: *Blood* 79 (2), S. 503–511.

Ziegler-Heitbrock, L.; Ancuta, P.; Crowe, S.; Dalod, M.; Grau, V.; Hart, D. N. et al. (2010): Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. In: *Blood* 116 (16), S. e74–e80. DOI: 10.1182/blood-2010-02-258558.

Zucker-Franklin, D. (1981): Endocytosis by human platelets: metabolic and freeze-fracture studies. In: *J. Cell Biol.* 91 (3 Pt 1), S. 706–715.

## **9 Anhang**

### **9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Damen und Herren Adamkiewicz, Arabin, Augsten, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Becker, Berger, Bertoune, Bien, Bliemel, Bonaterra, Bösner, Bücking, Burchert, Carl, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Dettmeyer, Dodel, Dreffke, Duda, Eickmann, Eikmann, Eivazi, Engenhardt-Cabillic, Ermisch, Feldmann, Feuser, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Geks, Glatzl, Gress, Grimm, Heinis, Hertl, Heyse, Hofmann, Hoyer, Hundt, Irsusi, Jospehs, Kalder, Kann, Kaufmann, Kinscherf, Kircher, Köhler, Kolb-Niemann, König, Krautheim, Krug, Kruse, Kühne, Kühnert, Leinweber, Lill, Lohoff, Luster, Mahnken, Maier, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Pantazis, Patrascan, Pape-Meyer, Peterlein, Pfützner, Plant, Piechowiak, Preisig-Müller, Reese, Renz, Richter, Riera Knorrenschild, Rost, Ruchholz, Schäfer, Schieffer, Schneider, Schüffel, Schulze, Schütz, Sekundo, Seifart, Sevinc, Shams-Eldin, Sommer, Steinfeldt, Teymoortash, Thieme, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Werner, Westermann, Wiegand, Wilhelm, Wißniowski, Wrocklage, Wulf, Zemlin, Zoremba

## 9.2 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bauer dafür bedanken, dass ich meine Doktorarbeit an diesem Institut durchführen durfte, sowie für die Bereitstellung dieses Themas, die wissenschaftliche Begleitung durch diese Arbeit und die Erstellung des Erstgutachtens.

Besonders danke ich meinem Betreuer Dr. Andreas Kaufmann für die kompetente und tolle Betreuung, die außerordentliche Geduld, die Motivation, für das mehrmalige Korrekturlesen meiner Arbeit und seine Unterstützung

Ein großer Dank gilt auch Gundi für die Organisation der Bestellungen und ihre Hilfe bei der Elutration, die mir das Arbeiten sehr erleichtert hat.

Der ganzen Arbeitsgruppe, sowie allen Mitgliedern des Instituts danke ich dafür mich so warm aufgenommen zu haben, für die schöne Zeit die ich im Labor hatte, das ungezwungene und lockere Arbeitsklima, die Ermutigungen und die Anregungen.

Ganz besonders danke ich Viki für die tolle Einarbeitung und ihre unglaubliche Hilfsbereitschaft in jeder Phase dieser Arbeit.

Meinem Freundeskreis danke ich für den großartigen Rückhalt und die ständige Bereitschaft sich meinen Kummer anzuhören und ihn zu bekämpfen.

Ich danke meiner ganzen Familie für großartigen Zusammenhalt und dafür immer einen sicheren Rückzugsort zu haben, wenn ich einen brauche.

Ich danke Carsten dafür mich mit beständiger, mittelsanfter Gewalt dazu gebracht zu haben diese Doktorarbeit tatsächlich niederzuschreiben.

Sebastian gebührt ein besonderes Lob, da er mehr als nur einmal seine eigenen Interessen hintangestellt hat, um mir zu helfen und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Hilfe stand.

Ich möchte meinen Eltern dafür danken, dass sie mich stets seelisch, moralisch und finanziell unterstützten, in allen Belangen für mich da waren, mich immer wieder ermutigten und aufbauten, mir immer den Rücken frei hielten und mir somit meinen beruflichen Werdegang ermöglichten.



